



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

AMANDA DONATTI

IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS PARA PACIENTES COM  
ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO:  
*UMA ANÁLISE MULTIÔMICA*

CAMPINAS

2021

AMANDA DONATTI

IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS PARA PACIENTES COM  
ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO:  
*UMA ANÁLISE MULTIÔMICA*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES  
COORIENTADOR: DR. RODRIGO SECOLIN

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA  
ALUNA AMANDA DONATTI, E ORIENTADA PELA  
PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES.

CAMPINAS

2021

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

Donatti, Amanda, 1991-  
D715i Identificação de variantes genéticas para pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico : uma análise multiômica / Amanda Donatti. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientadores: Íscia Teresinha Lopes Cendes e Jorgen Kjems.  
Coorientador: Rodrigo Secolin.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.  
Em cotutela com: Aarhus University. Interdisciplinary Nanoscience Center.

1. Acidente Vascular Cerebral. 2. Exoma. 3. MicroRNAs. 4. Metabolômica. 5. Biomarcadores. I. Lopes Cendes, Íscia Teresinha, 1964-. II. Kjems, Jorgen. III. Secolin, Rodrigo. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. VI. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Identification of genetic variants in patients with ischemic stroke : a multi-omic analysis

**Palavras-chave em inglês:**

Stroke  
Exome  
MicroRNAs  
Metabolomics  
Biomarkers

**Área de concentração:** Fisiopatologia Médica

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Íscia Teresinha Lopes Cendes [Orientador]  
Monica Barbosa de Melo  
Wilson Nadruz Junior  
Viviane Hiroki Flumignan Zetola  
Adriana Bastos Conforto

**Data de defesa:** 22-03-2021

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0535-3724>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3066752844771772>

# **COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

**AMANDA DONATTI**

---

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES**

**COORIENTADOR: DR. RODRIGO SECOLIN**

---

## **MEMBROS TITULARES:**

- 1. PROFA. DRA. ÍSCIA TERESINHA LOPES CENDES (PRESIDENTE) (ORIENTADORA)**
  - 2. PROFA. DRA. MONICA BARBOSA DE MELO**
  - 3. PROF. DR. WILSON NADRUZ JUNIOR**
  - 4. PROFA. DRA. VIVIANE HIROKI FLUMIGNAN ZETOLA**
  - 5. PROFA. DRA. ADRIANA BASTOS CONFORTO**
- 

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

**Data de Defesa: 22/03/2021**

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu esposo, minha mãe e à toda minha família,  
por todo apoio e confiança na realização deste sonho.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço à minha orientadora Dra. Íscia Lopes-Cendes pela oportunidade de desenvolver este trabalho sob sua orientação em seu laboratório, pelos ensinamentos e valores que me foram passados e pelo grande exemplo profissional que se tornou para mim.*

*Agradeço a todos os coautores deste trabalho por toda amizade, dedicação e colaboração no desenvolvimento e discussão do projeto e resultados. Sem vocês este trabalho não teria sido concretizado.*

*Ao Dr. Jørgen Kjems pelo aceite de supervisão durante meu estágio de pesquisa no exterior, no qual parte deste trabalho foi realizado, e por todos os ensinamentos e experiências profissionais que me proporcionou.*

*À Dra. Ljubica Tasic, do Instituto de Química da UNICAMP, pela colaboração, ajuda e discussão de parte deste trabalho de doutorado.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo #2015/25607-0 - pelo apoio financeiro na realização deste doutorado.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro durante o estágio de pesquisa realizada no exterior, o qual foi de grande importância para a discussão dos resultados desse projeto e planejamento de estudos futuros.*

*À Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e ao Centro de Nanociência Interdisciplinar (iNANO), da Universidade de Aarhus, Dinamarca, por todo apoio burocrático, financeiro e estrutural no desenvolvimento do meu estágio e projeto de doutorado.*

*A todos os amigos e colegas do Laboratório de Genética Molecular e do Hospital de Clínicas da UNICAMP por toda colaboração e apoio profissional e pessoal na realização deste trabalho.*

*Muito Obrigada*

*Amanda Donatti*

## **EPÍGRAFE**

*"Precisamos especialmente de imaginação nas ciências. Nem tudo é matemática e nem tudo é lógica simples, é também um pouco de beleza e poesia"*

*Maria Montessori*

## RESUMO

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é uma das doenças que mais acomete a população mundial, sendo uma das principais causas de morte e incapacitação. O subtipo isquêmico é o mais frequente, atingindo em torno de 80% dos pacientes com AVC. Apesar de fatores de risco de exposição ambiental terem sido estabelecidos para o AVC, esses contribuem com aproximadamente 60% da probabilidade de desenvolvimento do quadro, mostrando que fatores genéticos também influenciam a ocorrência da doença. Alguns estudos identificaram variantes genéticas comuns putativamente associadas ao fenótipo em pacientes com AVC, porém, a maioria não se classifica como uma variante causal. Além disso, é possível que variantes raras sejam responsáveis por parte da herdabilidade do AVC, contribuindo com uma porcentagem do risco para o seu desenvolvimento. Outro ponto a se considerar é a natureza multifatorial do AVC, onde espera-se uma interação de fatores genéticos e ambientais determinando as alterações biológicas que levam a doença. Essas interações podem gerar biomarcadores moleculares que por sua vez podem ser utilizados na prática clínica auxiliando o diagnóstico ou no estabelecimento do prognóstico para a doença. Desse modo, fatores de risco distintos podem convergir na determinação de mecanismos moleculares comuns, afetando a regulação da expressão gênica em pacientes com AVC. Isso posto, os objetivos desse estudo são: **i)** avaliar a contribuição de variantes genômicas raras presentes nas regiões codificantes do genoma humano em pacientes com AVC isquêmico. **ii)** determinar o padrão de expressão de microRNAs circulantes em pacientes com AVC isquêmico, nas fases aguda e crônica da doença, e **iii)** determinar o padrão metabólico em plasma de pacientes com AVC isquêmico, nas fases aguda e crônica da doença. Utilizando o sequenciamento de nova geração avaliamos o exoma de 130 pacientes com AVC isquêmico, o padrão de expressão de microRNAs em 154 indivíduos, incluindo 53 controles, e o padrão metabólico do plasma em 52 indivíduos, incluindo 14 controles. A análise de exoma permitiu a identificação de 523 variantes raras em 53 genes de interesse para o AVC isquêmico, entre eles destacamos *COL4A3*, *COL6A3*, *FGFR2*, *FVIII*, *HLA-B*. Esses genes fazem parte prioritariamente das vias de biossíntese de colágeno, coagulação sanguínea, inflamação, angiogênese e integridade vascular. Além disso, identificamos microRNAs circulantes com expressão diferencial em pacientes nas diferentes fases do AVC, sendo que os

microRNAs let-7, mir-182 e mir-324 estavam diferencialmente expressos na fase aguda do AVC, enquanto o mir-34c está diferencialmente expresso na fase crônica da doença. Comparando o padrão de expressão dos microRNAs na fase aguda e crônica, observamos alterações nos níveis de expressão dos microRNAs mir-142, mir-16, mir-206 e mir-30a. Também observamos similaridade entre os microRNAs identificados na análise do plasma total e aqueles associados a vesículas extracelulares. Utilizando técnicas de RMN, identificamos metabólitos associados com a fase aguda do AVC como formato, piruvato e GlycA. Por sua vez, na fase crônica, os níveis do glutamato eram diferentes em paciente, quando comparado aos controles. Interessante mencionar que os metabólitos identificados em níveis diferentes nos pacientes possuem relação com os mesmos processos fisiológicos identificados na análise de microRNAs. Em conclusão, identificamos variantes raras em genes de interesse para o AVC, como o *USP7*, não descrito na literatura para a doença. Estas podem contribuir para os riscos de ocorrência e para a gravidade do AVC isquêmico. Além disso, identificamos microRNAs e metabólitos circulantes específicos para diferentes fases do AVC isquêmico, incluindo algumas moléculas inéditas para o AVC isquêmico, porém, com mecanismos relevantes para a doença. Nossos resultados, indicam potenciais biomarcadores para o AVC isquêmico que após passar por etapas adicionais de validação, possam ser usados no desenvolvimento de estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento para pacientes com AVC isquêmico.

**Palavras-Chave:** AVC; Exoma; microRNAs; Metabolômica; Biomarcadores

## ABSTRACT

Stroke is one of the most frequent diseases worldwide and one of the leading causes of death and disability. Ischemic stroke is the most common subtype, affecting around 80% of the patients. Although environmental risk factors have been established to increase the risk of stroke, they contribute only with approximately 60% of the probability of developing the disease. Thus, genetic factors also play a role in the predisposition to stroke. Some studies identified common genetic variants putatively associated with stroke. However, it is also possible that rare variants may contribute to the heritability of the disorder. Furthermore, stroke is a multifactorial disorder, where it is expected an interaction of different genetic and environmental factors to determine the biological alterations leading to disease. These interactions can create molecular biomarkers that, in turn, may be used in clinical practice to assist in the diagnose or to establish disease prognosis. In this way, distinct risk factors might converge to determine common molecular mechanisms, which may affect gene expression regulation in patients with stroke. Therefore, the aims of this study are: i) to evaluate the contribution of rare genetic variants to the risk of developing ischemic stroke; ii) to determine the circulating microRNAs expression pattern in patients with ischemic stroke, in both the acute and chronic stage of the disease; and iii) to determine the metabolomic pattern on plasma samples from patients with ischemic stroke, in both the acute and chronic stage of the disease. Using next-generation sequencing, we evaluated the exome of 130 patients with ischemic stroke, the plasma microRNA expression pattern of 154 individuals, including 53 controls, and the metabolomic pattern from the plasma of 52 individuals, including 14 controls. The exome analysis allowed us to identify 523 rare variants in 53 genes of interest to ischemic stroke, from which we highlight *COL4A3*, *COL6A3*, *FGFR2*, *FVIII*, *HLA-B*. These genes are primarily part of the following biological pathways: collagen biosynthesis, blood coagulation, inflammation, angiogenesis, and vascular integrity. Furthermore, we identified circulating microRNAs with a differential expression in different phases of ischemic stroke. The microRNAs let-7, mir-182, and mir-324 were differentially expressed in the acute phase of stroke. In contrast, mir-34c was differentially expressed in the chronic phase of ischemic stroke. Comparing the microRNAs expression pattern on acute and chronic phases, we observed changes in expression levels of microRNAs mir-142, mir-16, mir-206, and mir-30a. We also observed

similarities between microRNAs identified in plasma and those associated exclusively with extracellular vesicles. We identified metabolites associated with acute stroke in plasma of patients by NMR techniques, such as formate, pyruvate, and GlycA. During the chronic phase, the level of glutamate was altered in patients when compared to controls. Interestingly, the metabolites identified as differentially abundant in patients are related to similar biological pathways as the microRNAs found to be differentially expressed in patients. In conclusion, we identified rare variants in candidate genes, as USP7, which were not previously identified to ischemic stroke, that may predict the risk of occurrence and the severity of ischemic stroke. Also, we identified circulating microRNAs and metabolites specific for the different stages of ischemic stroke, and that have not been observed in ischemic stroke patients, that should be validated in broader clinical studies. These molecules are potential disease biomarkers and might help, in the future, the development of new strategies to prevent, diagnose and treat patients with ischemic stroke.

**Keywords:** Stroke; Exome; microRNAs; Metabolomics; Biomarkers

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Principais causas de mortalidade global em **(A)** 2016 e **(B)** entre 2016 e 2000; **(C)** Principais causas de mortalidade no Brasil, em 2016 (5).....27
- Figura 2.** Mortalidade na população brasileira devido ao AVC, classificada por etiologia (isquêmico ou hemorrágico). **A)** Classificação da mortalidade na população brasileira por faixa etária; **B)** Classificação da mortalidade por sexo e faixa etária. Nesse último, foi considerado apenas indivíduos adultos, já que não há ocorrência significativa nas idades menores.....29
- Figura 3.** Mecanismos de evolução dos tipos de AVC isquêmico mais frequentes: cardioembólico (A) e aterosclerose de grandes artérias (B). **(A)** Ocorre a formação de um trombo no coração que, por defeitos cardíacos, se desloca até a região cerebral, ocluindo uma artéria e causando um AVC. **(B)** Ocorre a formação de trombos sobre as placas ateroscleróticas nas artérias intra ou extracerebrais, ocluindo-as e bloqueando o fluxo sanguíneo para o cérebro..... 32
- Figura 4.** Evolução do AVC isquêmico ao longo do tempo, descrevendo os mecanismos moleculares ativados em cada estágio da doença. Adaptado de (52). 37
- Figura 5.** Principais tipos de vesículas extracelulares: exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. Modificado de (63).....39
- Figura 6.** Fluxograma de análise dos dados de sequenciamento de exoma total a partir dos dados brutos, utilizando protocolo de boas práticas do *Genome Analysis Toolkit* (GATK), do Broad Institute [2], [3]. Nas caixas detalhamos a etapa da análise dos exomas; em azul, mostramos as ferramentas utilizadas para análise; por fim, em roxo, o formato dos arquivos gerados. Criado com Biorender.com.....54
- Figura 7 -** Principais vias moleculares associadas aos genes com variantes identificadas na análise de sequenciamento de exoma dos pacientes com AVC isquêmico. ....57
- Figura 8 -** Vias moleculares alteradas com as variantes gênicas patogênicas e potencialmente patogênicas identificadas no sequenciamento do exoma de pacientes com AVC isquêmico (tabela 4).....62
- Figura 9 -** Corrida de Bioanalyzer mostrando a integridade, concentração e tamanho das bibliotecas de RNA-Seq. O tamanho das bibliotecas de microRNAs deve ser de 180pb. O pico de 159pb refere-se aos picos de adaptadores da biblioteca. .... 70

<b>Figura 10.</b> Classificação do AVC nas fases aguda e crônica da casuística. ....	73
<b>Figura 11.</b> Distribuição das escalas de NIHSS entre os pacientes nas fases aguda e crônica do AVC isquêmico. A casuística do grupo de fase aguda está simbolizada em preto e vermelho, representando a evolução dos pacientes, com boa taxa de recuperação dos déficits. A casuística da fase crônica, representada em verde e azul, mostra uma leve recuperação dos déficits, mas com taxa menor do que a dos pacientes da fase aguda. ....	74
<b>Figura 12.</b> Distribuição da escala mRs para os pacientes da fase aguda (preto) e da fase crônica (vermelho). ....	75
<b>Figura 13.</b> Distribuição da classificação dos pacientes das fases aguda e crônica, de acordo com o Índice de Barthel. Em preto, apresenta-se a distribuição para a fase aguda, enquanto em vermelho, para a fase crônica. ....	76
<b>Figura 14.</b> Análise de qualidade dos dados sequenciados para microRNAs. A) e B) mostram a relação entre quantidade de <i>reads</i> e os tamanhos das bibliotecas. <b>A)</b> A relação dos dados brutos com as bibliotecas mostrou uma contaminação de fragmentos pequenos que poderiam influenciar nos resultados, causando erros de análise. Dessa forma, foi realizado um filtro para seleção de bibliotecas com mais de 1 milhão de <i>reads</i> , o que eliminou a contaminação <b>(B)</b> . Em <b>C)</b> , verificamos a variabilidade das amostras entre os grupos através de um gráfico de PCA. Os grupos apresentam grande similaridade entre as amostras, não sendo possível distinguir entre eles. Contudo, o grupo de pacientes em fase crônica, mostrou uma variabilidade maior entre as amostras do mesmo grupo. ....	77
<b>Figura 15.</b> Análise de expressão diferencial de microRNAs comparando grupos de AVC na fase aguda e indivíduos controles. Foram identificados 33 microRNAs diferencialmente expressos, conforme mostrado em azul. ....	78
<b>Figura 16 -</b> Análise de rede entre os microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes com AVC na fase aguda e indivíduos controles. Os círculos vermelhos representam os genes, enquanto os microRNAs são representados por quadrados azuis. As linhas cinzas indicam as interações entre as moléculas e os genes alvo, enquanto as amarelas mostram as interações compartilhadas entre os microRNAs de interesse let-7a, let-7b, let-7c, mir-182 e mir-324. ....	82
<b>Figura 17 -</b> Análise de expressão diferencial de microRNAs comparando grupos de AVC na fase aguda e AVC na fase crônica. Foram identificados 14 microRNAs diferencialmente expressos, conforme mostrado em azul. ....	83

<b>Figura 18</b> - Análise de rede entre os microRNAs de interesse para AVC na fase aguda vs AVC na fase crônica e os respectivos genes alvo. <b>A)</b> Interação entre os microRNAs diferencialmente expressos identificados exclusivamente para essa comparação (mir-206 e mir-30a). Os microRNAs compartilham regulação com os genes <i>BDNF</i> , <i>IGF1R</i> e <i>MET</i> . <b>B)</b> Interação entre os microRNAs diferencialmente expressos identificados tanto para AVC na fase agudo com AVC na fase crônica quanto para controles (let-7g, mir-142 e mir-16). Os microRNAs compartilham regulação com os genes <i>CCNT2</i> , <i>ATG9A</i> e <i>HMGA1</i> . ....	85
<b>Figura 19</b> - Análise de expressão diferencial de microRNAs comparando grupos de AVC na fase crônica e controles. Foi identificado apenas 1 microRNA diferencialmente expresso, conforme mostrado em azul. ....	86
<b>Figura 20</b> - Análise de rede mostrando as 154 interações gênicas do microRNA mir-34c. ....	88
<b>Figura 21.</b> Escalas NIHSS dos pacientes com AVC isquêmico em fase crônica. Comparativo entre as escalas dos pacientes selecionados para a análise de microRNAs associados com EVs e de plasma total. ....	99
<b>Figura 22.</b> Composição molecular da EVs purificadas de amostras de AVC isquêmico, após sequenciamento de pequenos RNAs. ....	100
<b>Figura 23.</b> Distribuição das moléculas sequenciadas presentes em EVs, por amostra. ....	100
<b>Figura 24.</b> 28 microRNAs diferencialmente expressos para a comparação entre AVC e controles para amostras de vesículas extracelulares. ....	101
<b>Figura 25</b> - Análise de predição fenotípica dos microRNAs identificados para EVs. Os microRNAs considerados nessa análise foram os que apresentaram valor de p menor que 0,01. <b>A-G)</b> Valores de predição individualmente para cada microRNA selecionado. <b>H)</b> Valor de predição combinada entre os sete microRNAs selecionados: mir-122-5p, mir-10b-5p, mir-215-5p, mir-141-5p, mir-210-3p, mir-320d e mir-34a-5p. A predição, com essa combinação, foi considerada perfeita, porém, necessita maiores validações para evitar falsos-positivos. ....	105
<b>Figura 26.</b> Distribuição da idade dos pacientes e controles analisados na casuística de análise de dados metabólicos. ....	112
<b>Figura 27.</b> Distribuição do sexo dos pacientes e controles analisados para o estudo de metabólica. ....	113

<b>Figura 28.</b> Distribuição dos principais fatores de risco para AVC isquêmico na casuística de pacientes e controles analisados para metabólica. ....	113
<b>Figura 29.</b> Caracterização das amostras dos pacientes com AVC isquêmico aterosclerótico com base nas escalas de NIHSS por grupo. ....	114
<b>Figura 30.</b> Análise PLS-DA para as comparações realizadas entre casos e controles. É possível verificar uma classificação entre os grupos, porém, com baixo poder preditivo. <b>A)</b> Grupo de pacientes com AVC na fase aguda e Controles; <b>B)</b> Grupo de pacientes com AVC na fase crônica e Controles; <b>C)</b> Comparação entre AVC na fase aguda e AVC na fase crônica. ....	115

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais escalas de avaliação da gravidade do AVC e seus significados de acordo com cada pontuação. As escalas listadas são NIHSS e mRs. ....	34
<b>Tabela 2.</b> Caracterização das amostras analisadas para o sequenciamento do exoma (%). Os dados descritos como NA referem-se à declaração do paciente como “Não sabe/Não declarou” ou à falta de informação clínica desses pacientes. ....	55
<b>Tabela 3 -</b> Descrição das vias moleculares associadas aos genes com variantes identificadas na análise de sequenciamento de exoma dos pacientes com AVC isquêmico. ....	57
<b>Tabela 4 –</b> Lista das variantes associadas com as principais vias moleculares identificadas no sequenciamento do exoma para pacientes com AVC isquêmico (Tabela 2). ....	59
<b>Tabela 5 -</b> Variantes gênicas classificadas como patogênicas ou potencialmente patogênicas observadas no sequenciamento do exoma de pacientes com AVC isquêmico. (NA) = não informado. ....	61
<b>Tabela 6.</b> Descrição das principais comorbidades da casuística (%). ....	72
<b>Tabela 7.</b> microRNAs diferencialmente expressos e exclusivos para a comparação entre pacientes com AVC na fase aguda e indivíduos controles. (P <sub>adj</sub> = p-valor ajustado por testes estatísticos). ....	78
<b>Tabela 8.</b> Vias moleculares identificadas na comparação de microRNAs entre AVC na fase aguda e controles. ....	81
<b>Tabela 9.</b> microRNAs diferencialmente expressos para a comparação de AVC na fase aguda e AVC na fase crônica. (P <sub>adj</sub> = p-valor ajustado por testes estatísticos) ....	83
<b>Tabela 10.</b> Vias moleculares associadas com os microRNAs identificados na comparação de AVC na fase aguda e AVC na fase crônica. ....	84
<b>Tabela 11 -</b> microRNA diferencialmente expresso na comparação de pacientes com AVC na fase crônica e indivíduos controles. (P <sub>adj</sub> = p-valor ajustado por testes estatísticos) ....	87
<b>Tabela 12.</b> Vias moleculares associadas com o microRNA mir-34c identificado para a fase crônica do AVC. ....	87
<b>Tabela 13.</b> microRNAs diferencialmente expressos (p <sub>valor</sub> ≤ 0,05) na comparação entre pacientes e controles, para moléculas presentes em EVs. (P <sub>adj</sub> = p-valor ajustado por testes estatísticos) ....	101

<b>Tabela 14.</b> Vias moleculares afetadas pelos microRNAs diferencialmente expressos na comparação pacientes versus controle, para amostras provenientes de EVs. ..	103
<b>Tabela 15.</b> Deslocamentos químicos referentes às moléculas de água e EDTA excluídas dos espectros .....	111
<b>Tabela 16.</b> <i>Relação de metabólitos identificados na comparação entre AVC na fase aguda e controles. Os valores listados de fold change (FC), VIP e p-valor estão descritos de acordo com cada deslocamento químico do metabólito. ....</i>	116
<b>Tabela 17.</b> <i>Relação de metabólitos identificados na comparação entre AVC na fase crônica e controles. Os valores listados de fold change (FC), VIP e p-valor estão descritos de acordo com cada deslocamento químico do metabólito. ....</i>	117

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

Siglas	Significado
$\mu\text{m}$	Micrômetro
1D	Unidimensional
$^1\text{H-RMN}$	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons
A $\beta$	Proteína beta amilóide
AGO2	Proteína Agonata2
APOE	Apolipoproteína E
ASCOD	Sigla para os principais causas de AVC isquêmico ( <u>A</u> terosclerose, <u>S</u> mall vessel disease, <u>C</u> ardioembólico, <u>O</u> utras causas e <u>D</u> issecção)
ATG9A	Relação à autofagia 9A
ATR	Ataxia telangiectasia e a proteína 1 relacionada à Rad3
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BCAA	Aminoácidos de cadeia ramificada
BDNF	Fator neurotrófico derivado cerebral
Beclin1	Ortólogo mamífero do gene 6 associado com autofagia de leveduras
BIPMed	Iniciativa Brasileira de Medicina de Precisão
BWA	Alinhamento Burrows-Wheeler
Ca $^{2+}$	Íon de Cálcio
CADASIL	Arteriopatia cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia
CARASIL	Arteriopatia cerebral autossômica recessiva com infartos subcorticais e leucoencefalopatia
CCND2	Ciclina D2
CCNT2	Ciclina T2
CD28	Grupo de diferenciação 28
ChREBP	Proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos
circRNA	RNA circular
CMH	Complexo principal de histocompatibilidade
COL4A3	Colágeno tipo 4 alfa 3

COL6A3	Colágeno tipo 6 alfa 3
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CYP2C19	Citocromo P450 2C19
D2O	Água Deuterada
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIF4G2	Fator de iniciação translacional eucariótica 4, gama 2
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
eNOS	Óxido Nítrico Sintase
EV	Vesícula Extracelular
FA	Fibrilação Atrial
FAM222B	família de sequência similar 222 membro B
FGFR	Receptor do fator de crescimento de fibroblastos
FGFR2	Receptor 2 do fator de crescimento de fibroblastos
FoxO1	Gene codificante da proteína de caixa de garfo O1
FSR	Substrato do receptor do fator de crescimento de fibroblastos
FSRP	Perfil Framingham de Risco para AVC
FVIII	Fator de coagulação 8
GATK	<i>Genome Analysis Toolkit</i>
GFAP	Proteína Fibrilar Ácida da Glia
GLA	$\alpha$ -galactosidase A
GlycA	Glicoproteínas A (glicoproteínas e glucosaminas N-acetiladas )
GlycB	Glicoproteínas B (grupos acetilas de ácido N-acetilneuramínico)
GWAS	Estudo de Associação Genômica (" <i>Genome-Wide Association Study</i> ")
HAS	Pressão Arterial Sistêmica
HDAC9	Histona desacetilase 9
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HLA-B	Antígeno B de leucócitos humanos
HLH	Proteínas Helix-Loop-Helix

HMDB	Base de Dados do Metaboloma Humano
<i>HMGA1</i>	Grupo de alta mobilidade AT 1
<i>HTRA1</i>	Serina protease HTRA1
<i>IGF1R</i>	Receptor 1 do fator de crescimento como insulina
iNANO	Centro Interdisciplinar de Neurociências
indels	Inserções e deleções genômicas
kDa	kilo Daltons
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
log2FC	Fold Change (log2)
<i>LOX1</i>	Receptor 1 da LDL oxidada do tipo lectina
LysoPE	Lisofosfatidiletanolamina
<i>MALAT1</i>	Transcrito 1 associado à metástase do adenocarcinoma pulmonar
<i>MAPK/ERK</i>	Proteína quinase ativadora de mitógenos/Proteína quinase reguladora de sinal extracelular
<i>MET</i>	Receptor de tirosina quinase
Mg <sup>2+</sup>	Íon de Magnésio
<i>MHz</i>	Mega Hertz
miRNA	microRNA
<i>mL</i>	Mililitro
<i>MMP9</i>	Matrix metalopeptidase 9
mRNA	RNA mensageiro
mRs	Escala Modificada de Rankin
MS	Espectroscopia de Massas
<i>MTHFR</i>	Metilenotetrahidrofolato redutase
mTOR	Alvo mecânico da rapamicina
<i>n.d.</i>	Não Descrito
NCAM	Molécula de adesão células neurais
ncRNA	RNAs não codificantes
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
NIHSS	Escala de AVC do Instituto Nacional da Saúde dos Estados Unidos ( <i>National Institute of Health Stroke Scale</i> )

nM	Nanomolar
nm	Nanômetros
<i>nNOS</i>	Óxido Nítrico Neuronal
<i>NOTCH3</i>	Proteína 3 do homólogo do locus neurogênico notch
<i>Otx2</i>	Homeobox ortodentículo 2
padj	p-Valor ajustado para múltiplos testes
<i>PAI-1</i>	Inibidor-1 do ativador do plasminogênio
pb	Pares de Base
PC 50/50	Fosfatidil colina 50/50
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>PDIA5</i>	Precursor A5 da proteína dissulfato-isomerase
PEG	Polietilenoglicol
<i>PI3K</i>	Fosfatidilinositol 3-quinases
piRNA	RNA com interação com PIWI
<i>PITX2</i>	Fator 2 de transcrição de homeodomínio do tipo pareado
PKA	Proteína quinase A
<i>PLG</i>	Plasminogênio
<i>PLS-DA</i>	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais
<i>ppm</i>	Partes por Milhão
pvalue	p-Valor
<i>RE</i>	Retículo Endoplasmático
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA-Seq	Sequenciamento das moléculas de RNA
<i>RNF213</i>	Proteína do dedo anelar 213
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNAs ribossomais
<i>SERPINA1</i>	Membro 1 da família da SERPIN
siRNA	RNAs de interferência
<i>SMAD2</i>	Membro 2 da família SMAD
SNP	Polimorfismo de Base única
snRNA	Pequenos RNAs nucleares

TBI	<i>Triple resonance broadband inverse</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de células T
<i>TGFBR1</i>	Receptor beta do fator de crescimento transformador I
<i>TGFβ</i>	Fator de transformação do crescimento beta
<i>THBS1</i>	Trombospondina 1
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
TMSP	Ácido trimetilsililpropanóico
TOAST	<i>Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment</i>
tRNA	RNAs transportadores
TRP	Potencial receptor transitório
UER	Unidade de Emergência Referenciada
<i>USP7</i>	Protease específica de ubiquitina 7
VIP	Variantes de importância na projeção
vs	Versus
WES	Sequenciamento do Exoma Completo
WGS	Sequenciamento do Genoma Completo
<i>ZFX3</i>	Proteína 3 da homeobox do dedo de zinco

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
OBJETIVOS GERAIS	51
<b>CAPÍTULO I – Variantes Genômicas</b>	<b>52</b>
1. Objetivos	52
2. Métodos	52
2.1. Casuística	52
2.2. Sequenciamento do Exoma	53
3. Resultados	55
3.1. Casuística	55
3.2. Sequenciamento do Exoma	56
4. Discussão	62
5. Considerações Finais	66
<b>CAPÍTULO II – RNAs não codificantes</b>	<b>67</b>
<b><i>Seção 1. Sequenciamento de microRNAs de Plasma Total</i></b>	<b>67</b>
1. Objetivos da Seção	67
2. Métodos	67
2.1. Casuística	67
2.2. Sequenciamento de microRNAs	68
2.3. Análise dos Dados	70
3. Resultados	71
3.1. Casuística	71
3.2. Sequenciamento de microRNAs	76
4. Discussão	88
5. Considerações Finais	96
<b><i>Seção 2. microRNAs Presentes em Vesículas Extracelulares</i></b>	<b>97</b>
1. Objetivos da Seção	97
2. Métodos	97
2.1. Casuística	97
2.2. Purificação das Vesículas Extracelulares e Sequenciamento de microRNAs	98
3. Resultados	99
3.1. Casuística	99

3.2. Sequenciamento de microRNAs	100
4. Discussão	105
5. Considerações Finais	107
<b>CAPÍTULO III - Metabolômica</b>	109
1. Objetivos	109
2. Métodos	109
2.1. Casuística	109
2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	110
3. Resultados	112
3.1. Casuística	112
3.2. Espectroscopia de RMN	114
4. Discussão	119
5. Considerações Finais	123
DISCUSSÃO GERAL	124
CONCLUSÃO GERAL	127
REFERÊNCIAS	129
ANEXOS	154
1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP	154

## INTRODUÇÃO

### *I. Acidente Vascular Cerebral*

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma doença multifatorial caracterizada por um bloqueio do fluxo sanguíneo para determinada região do cérebro, resultando em perdas das funções neurológicas, com déficits motores e sensoriais (1,2). As funções comprometidas pelo evento neurovascular variam de acordo com o local de ocorrência, gravidade e etiologia do AVC (1). Além disso, podem se apresentar de forma silenciosa ou devastadora, com perdas temporárias ou definitivas (1).

O AVC pode ser subdividido em dois tipos principais: isquêmico (OMIM #60137) e hemorrágico (OMIM #614519) (1).

O AVC isquêmico ocorre em 80 a 85% dos casos e é caracterizado pela formação de trombos nas artérias cerebrais, impedindo o fluxo sanguíneo e o suprimento de oxigênio para a área afetada (1–3). O AVC isquêmico pode ser classificado em cinco subtipos, de acordo com o mecanismo de dano aos vasos sanguíneos ou da causa da redução de fluxo sanguíneo para o cérebro: cardioembolismo, aterosclerose dos grandes vasos, oclusão dos pequenos vasos, outras causas e criptogênico (1,2,4). Essa classificação segue os parâmetros estabelecidos pelo *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment* (TOAST) (4).

O AVC hemorrágico, por sua vez, é o subtipo menos frequente, afetando de 15 a 20% dos casos de AVC. Esse subtipo caracteriza-se por uma ruptura de artérias cerebrais, com liberação de sangue para o tecido cerebral e espaços extravasculares no crânio (1). Esse subtipo tende a apresentar danos mais graves ao tecido, com maiores déficits ao paciente. Ele pode ser classificado em quatro subtipos, de acordo com os mecanismos de ocorrência e área afetada: hemorragia intracerebral, subaracnóide, subdural e epidural (1).

### *i. Epidemiologia do AVC*

Atualmente, o AVC é a segunda maior causa de mortalidade global, correspondendo a 10% das causas e afetando 5,7 milhões de pessoas ao redor do mundo (Figura 1A) (5). Devido à presença de comorbidades, hábitos alimentares, aumento da expectativa de vida e políticas públicas, a incidência e a mortalidade do

AVC são crescentes na população, sendo que, entre 2000 a 2016, houve um aumento de 600 mil vidas perdidas mundialmente por causa da doença (Figura 1B) (5).

No Brasil, aproximadamente 110 mil pacientes faleceram devido a um AVC em 2016, caracterizando-o como a segunda maior causa de mortalidade no país (Figura 1C) (5).

Além de altas taxas de mortalidade, o AVC é considerado uma das maiores causas de incapacidade mundial. Estudos mostram que, na população idosa afetada pela doença, 26% apresentam dificuldades na realização de atividades cotidianas após o evento (6,7). As principais causas dessa incapacitação são decorrentes de sequelas como hemiparesia e afasia e depressão pós AVC (6,7). A ocorrência de déficits cognitivos nos pacientes pós AVC, principalmente demência, também é um relevante fator de incapacitação em até 30% dos casos (8).

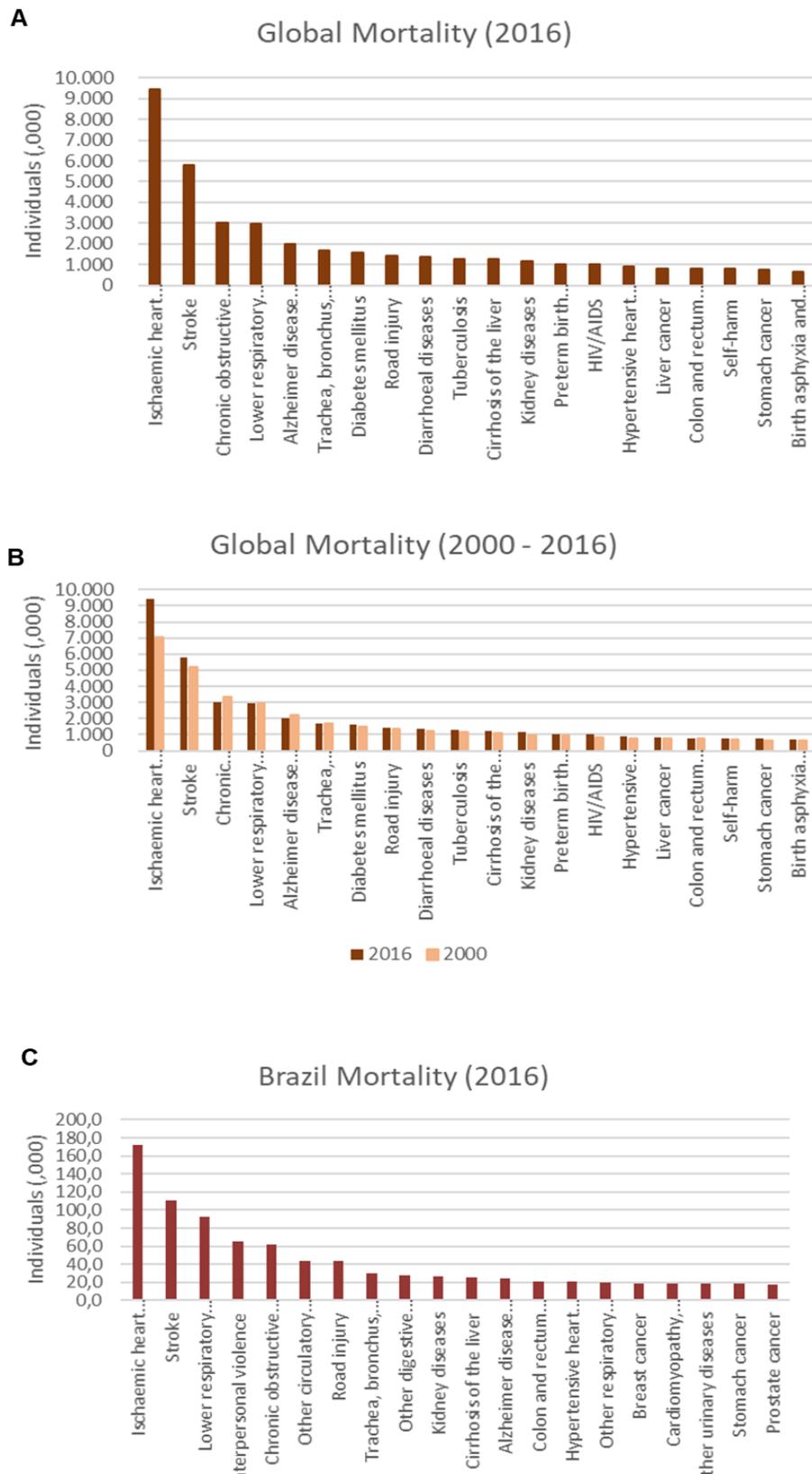


Figura 1. Principais causas de mortalidade global em (A) 2016 e (B) entre 2016 e 2000; (C) Principais causas de mortalidade no Brasil, em 2016 (5).

Devido às altas taxas de incidência, mortalidade e incapacidade, o AVC é considerado um assunto de políticas públicas, sendo motivo de grandes gastos financeiros. Estima-se que o investimento dado ao AVC em países ocidentais seja em torno de 3-4% do orçamento total destinado à saúde (6,9,10). Infelizmente, esses valores são discrepantes entre países desenvolvidos e em desenvolvimento (6).

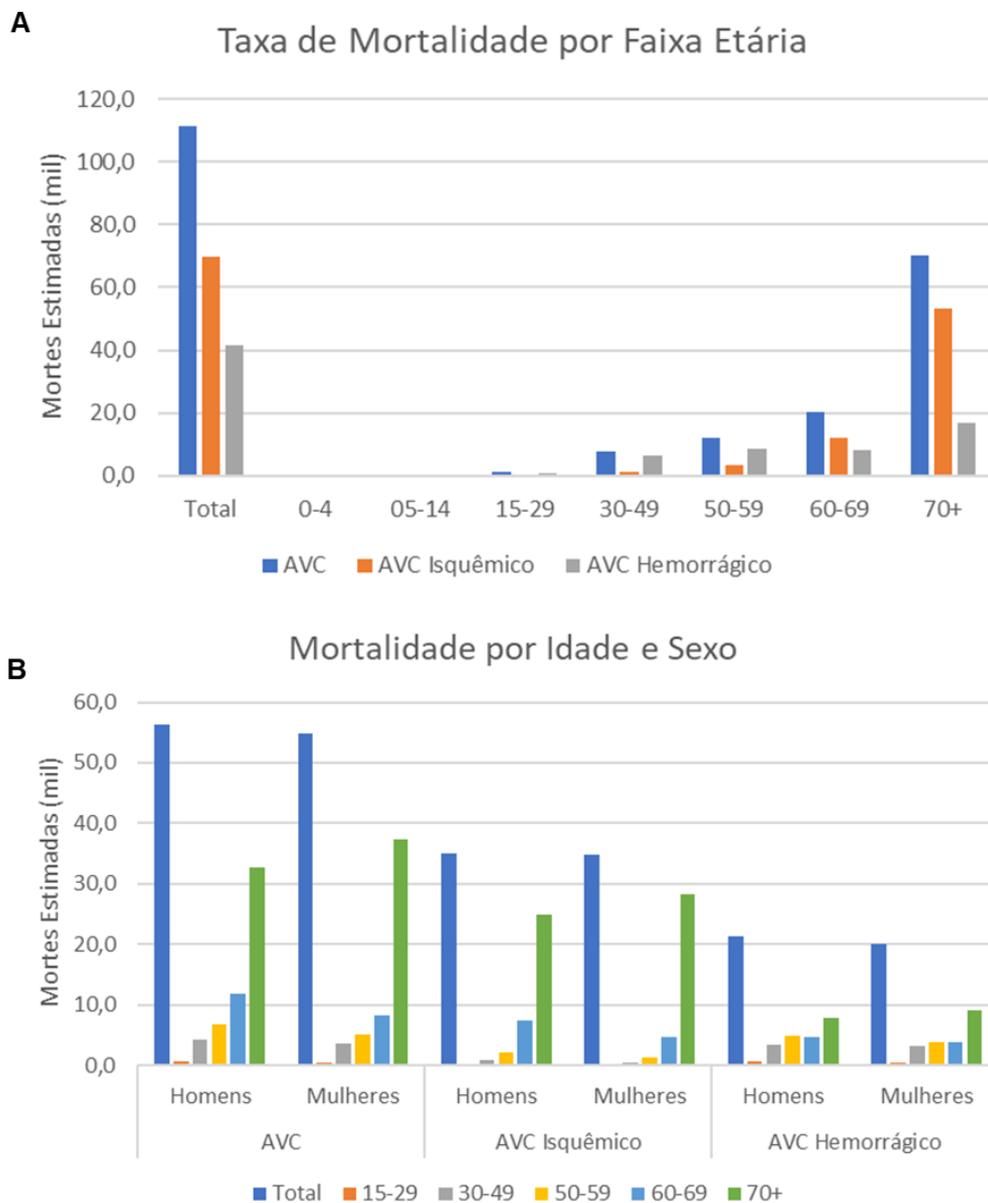
Nos Estados Unidos, o gasto médio com um paciente com AVC, em vida, é aproximadamente \$140 mil dólares (10,11). Em contrapartida, estudos revelam que, no Brasil, os gastos com tratamentos de pacientes, durante o período de internação, diferem entre os sistemas público e privado, estabelecendo-se em \$7470 e \$10404 dólares por paciente, respectivamente (12,13).

Anualmente, os gastos com o tratamento dos pacientes com AVC podem chegar a \$65 bilhões de dólares em países desenvolvidos, enquanto no Brasil, o gasto médio anual encontra-se em \$1,3 bilhão (10–12,14). Esses gastos podem variar de acordo com a gravidade, etiologia e tratamento do evento vascular (12,13).

Apesar da complexidade e multifatorialidade da doença, alguns fatores de risco, tanto modificáveis quanto não modificáveis, influenciam a ocorrência do AVC a curto, médio ou longo prazo (15). O efeito de fatores de risco para a incidência de AVC pode ser mensurado através do Perfil Framingham de Risco para AVC (FSRP) (16,17).

Dentre os fatores não modificáveis, encontram-se idade, sexo, etnia e histórico familiar. Apesar de alguns estudos mostrarem que não há grandes diferenças entre a ocorrência de AVC com base no sexo do indivíduo, há uma discussão sobre mulheres possuírem um aumento no risco de AVC a cada ano de vida e com a presença de fatores de risco modificáveis (18,19). Na figura 2, observamos a distribuição de mortalidade do AVC na população brasileira de acordo com a faixa etária e sexo dos pacientes. A mortalidade devido ao AVC tende a ser considerável a partir dos 30 anos para o AVC hemorrágico, e partir dos 50 anos para o AVC isquêmico (Figura 2A) (5).

Com relação a sexo, a incidência de AVC, na população brasileira, é semelhante entre homens e mulheres (Figura 2B) (5). Homens possuem maior taxa de mortalidade por AVC na faixa etária entre 60 e 69 anos, enquanto mulheres apresentam esse aumento na mortalidade após 70 anos de idade. Essa diferença pode ser devido à maior taxa de longevidade entre os indivíduos femininos (15).



**Figura 2.** Mortalidade na população brasileira devido ao AVC, classificada por etiologia (isquêmico ou hemorrágico). **A)** Classificação da mortalidade na população brasileira por faixa etária; **B)** Classificação da mortalidade por sexo e faixa etária. Nesse último, foi considerado apenas indivíduos adultos, já que não há ocorrência significativa nas idades menores.

Os fatores de risco são considerados modificáveis quando podem ser alterados ao longo da vida dos pacientes, e diferem em etiologia e idade dos pacientes (15). Para AVC isquêmico, os principais fatores de risco são hipertensão, tabagismo, diabetes, etilismo, dislipidemia, sedentarismo e obesidade (15,20). Para o AVC

hemorrágico, hipertensão, tabagismo e etilismo são as principais causas do evento (15,20). Pacientes jovens tendem a desenvolver AVC devido a uso de drogas ilícitas e contraceptivos hormonais, gravidez, dissecções de artéria, trombofilias e coagulopatias e à associação à alterações no forame oval patente (21).

Apesar dos fatores de risco clínicos citados acima representarem grande parte dos casos de AVC, 40% das ocorrências não são explicados por eles, sugerindo a influência de outros fatores, como a genética, no desenvolvimento do AVC (22).

Devido a esses fatores, estudos recentes visam identificar novos mecanismos e biomarcadores moleculares da doença, buscando novas formas de diagnóstico e tratamento do AVC.

## *ii. AVC isquêmico*

O AVC isquêmico é o mais frequente dos casos, sendo causado pelo bloqueio do fluxo sanguíneo cerebral através de coágulos e trombos nas artérias que irrigam o tecido. O diagnóstico desse evento é baseado na clínica do paciente e em exames de neuroimagem, como tomografia e ressonância magnética (23).

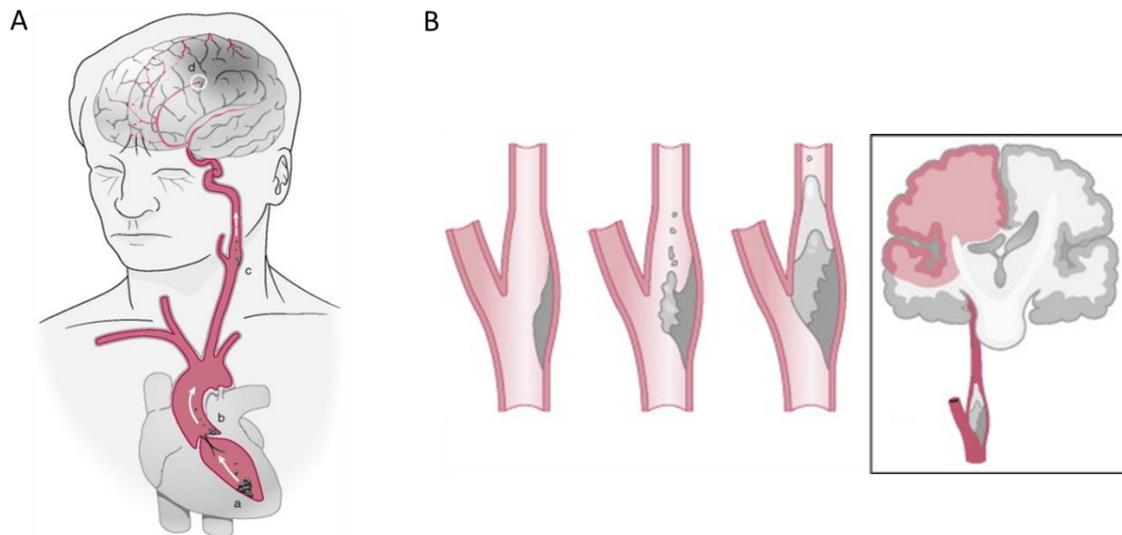
Como citado acima, o AVC isquêmico é categorizado em cinco subtipos, de acordo com a classificação TOAST. Os subtipos mais frequentes na população são o cardioembólico e a aterosclerose de grandes artérias.

No AVC embólico, ocorre a formação de um trombo fora da região cerebral, que, ao se soltar e deslocar, bloqueia uma artéria cerebral, impedindo o fluxo sanguíneo. É considerado um AVC cardioembólico quando esse trombo é formado no coração (Figura 3A) (1). Esse subtipo explica entre 14 e 30% dos casos de AVC isquêmico, podendo ser eficientemente prevenido com o uso de anticoagulantes orais (24–26). A maior causa de cardioembolia é fibrilação atrial (FA), seguida por comprometimento da parede do miocárdio e forame oval patente (25,26). No geral, AVCs cardioembólicos causam AVCs mais graves, quando comparados com outros subtipos de isquemia, devido às lesões em territórios corticais, com múltiplas áreas cerebrais afetadas (26).

No AVC aterosclerótico, ou de grandes artérias, há a formação de placas ateroscleróticas (constituídas por lipídeos e lipoproteínas) nas artérias intra e

extracranianas, obstruindo o fluxo sanguíneo cerebral (Figura 3B) (1). Por definição, um AVC é considerado aterosclerótico quando uma artéria cerebral ou cortical apresenta mais de 50% de estenose ou oclusão (4). Esse subtipo de AVC é responsável por aproximadamente 15% dos casos de AVC isquêmico e pode ser causado por estenoses carotídeas sintomáticas e assintomáticas, aterosclerose intracraniana ou de artérias vertebrais (27). Exames de neuroimagem podem identificar uma área isquêmica delimitada em localização distal de um vaso sanguíneo com estenose ou placa calcificada irregular (27). Independentemente da localização da aterosclerose, esse subtipo de AVC possui os mesmos fatores de risco: hipertensão, diabetes, dislipidemia e tabagismo (27). O controle dessas comorbidades tende a diminuir os riscos para desenvolver eventos isquêmicos, além de reduzir a taxa de mortalidade em pacientes com AVC aterosclerótico (27–29). O controle desses eventos é realizado por correto acompanhamento dos fatores de risco, uso de antiplaquetários, ou métodos cirúrgicos (endarterectomia), nos casos mais graves (27,30). A aterosclerose pode ser diagnosticada através de exames de neuroimagem, como a angiografia por ressonância magnética ou tomografia, ou por exames dos vasos sanguíneos, como o Doppler de carótidas (27).

O AVC lacunar, ou de pequenos vasos, afeta a região microvascular do cérebro: arteríolas, capilares, pequenos vasos e artérias cerebrais (31). Essa síndrome lacunar pode estar associada ao AVC, demência e envelhecimento, causando significativo déficit cognitivo (31,32). Esses AVCs apresentam déficits mais leves, quando comparados com os outros subtipos, apesar das pequenas e profundas lesões causadas (33). Esse evento geralmente afeta as regiões sub corticais, com danos na área cinzenta cerebral menores do que 1,5cm (26,32). Apesar dos mecanismos desses pequenos infartos não estarem completamente elucidados, histórico de hipertensão e diabetes auxiliam no seu diagnóstico e seu tratamento baseia-se no uso de estatinas e antiplaquetários (4,32,33).



**Figura 3.** Mecanismos de evolução dos tipos de AVC isquêmico mais frequentes: cardioembólico (A) e aterosclerose de grandes artérias (B). **(A)** Ocorre a formação de um trombo no coração que, por defeitos cardíacos, se desloca até a região cerebral, ocluindo uma artéria e causando um AVC. **(B)** Ocorre a formação de trombos sobre as placas ateroscleróticas nas artérias intra ou extracerebrais, ocluindo-as e bloqueando o fluxo sanguíneo para o cérebro.

O AVC pode ser classificado como de outras etiologias quando apresentar causas raras de AVC ou ocorrer em pacientes com improváveis fatores de risco, como pacientes jovens (4). As outras causas possíveis para o AVC podem ser dissecação de artéria, vasculopatias ou condições hematológicas, por exemplo. Para comprovar essa etiologia, as causas mais comuns de AVC devem ser excluídas por exames clínicos e de neuroimagem (4).

Quando não é possível determinar a causa do evento isquêmico, apesar de vasta investigação etiológica, ele é considerado criptogênico ou indeterminado (4).

Recentemente, uma nova classificação fenotípica para o AVC isquêmico também pode ser encontrada. A classificação ASCOD (**A**terosclerose, doença de pequenos vasos (**S**mall vessel disease), **C**ardioembolismo, **O**utras causas e **D**issecação) simboliza os cinco subtipos do AVC isquêmico, semelhante ao TOAST, porém, com uma escala adicional de graus de causalidade para cada subtipo (34). Com isso, a classificação ASCODs permite observar todas as doenças potencialmente causais e potencialmente causais ao AVC, reduzindo as taxas de AVCs isquêmicos criptogênicos (34). Essa classificação ocorre por cada subtipo (A, S, C, O, D) seguida por um número referente à sua causalidade: 1 (potencialmente causal), 2 (causalidade incerta), 3 (causalidade improvável), 0 (sem a doença) e 9

(dados insuficientes para classificação) (34). De acordo com Amarenco et al (2013), mesmo que não se identifique a causa primária de ocorrência do AVC, essa classificação permite o tratamento de causas secundárias, reduzindo os riscos de recorrência da doença (34).

O território cerebral afetado pelo AVC isquêmico influencia diretamente a gravidade e os déficits causados pelo evento (35,36). A isquemia é dividida em duas partes: o core e a penumbra. O primeiro é conhecido como o foco do evento isquêmico, no qual ocorre a perda neuronal definitiva e maior dano tecidual (37–39). A penumbra, por sua vez, é a área circundante ao core, intermediária entre ele e o tecido saudável, que apresenta danos neuronais reversíveis (37–39). Essa área sofre mais lentamente os efeitos da isquemia tecidual, de modo que cria-se uma janela terapêutica para minimizar a morte e danos cerebrais dessa região (37,39).

A realização de exames de neuroimagem na chegada dos pacientes ao hospital permite avaliar a região afetada pela isquemia, incluindo o foco de oclusão arterial, o tempo de evolução da isquemia e a presença de hemorragias (38). Os principais exames realizados no início dos sintomas, ou seja, na fase aguda do AVC, são tomografia computadorizada, angiotomografia e ressonância magnética (38). Esses exames auxiliam na avaliação de gravidade do AVC, assim como na investigação etiológica e condutas terapêuticas a serem adotadas pós evento (38). Apesar de cada exame apresentar finalidades específicas, eles são complementares e devem ser utilizados em conjunto para uma investigação etiológica completa (38).

Para a delimitação da gravidade do AVC, predição de prognóstico e orientação de tratamentos foram criadas escalas de avaliação neurológica, funcional e de independência dos pacientes (38,40–44). Cada escala possui particularidades e devem ser aplicadas corretamente para uma boa reprodutibilidade e validação dos achados (44). As escalas mais comuns de avaliação dos pacientes são a Escala de AVC desenvolvida pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, do inglês *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS), índice modificado de Rankin (mRs) e índice de Barthel (44).

A escala NIHSS contém 15 itens de avaliação do paciente que englobam informações sobre funções neurológicas e possíveis déficits após o evento isquêmico (41,44). Essa escala é eficaz para delimitação das sequelas dos pacientes pós AVC,

predição de prognóstico e área cerebral isquêmica, além de custos e tempo de internação hospitalar (38,44,45). Por isso, ela se torna uma boa opção para ser realizada na entrada do paciente no hospital, sendo um dos principais critérios de tratamento da fase aguda do AVC isquêmico (38,40,44). Entretanto, essa escala é inadequada para avaliação de força muscular e prescrição de exercícios para recuperação motora (41). Sua escala é progressiva, de modo que baixas pontuações indicam eventos mais leves. Pacientes que apresentam pontuação NIHSS baixas, tendem a apresentar boas recuperações, sem grandes sequelas pós AVC (38). Pontuações intermediárias, simbolizando AVCs de gravidade moderada, são beneficiadas de tratamentos medicamentosos, como trombolíticos, no início dos sintomas, resultando em melhora do prognóstico (38). Por fim, AVCs graves, com altas pontuações na escala, apresentam grandes sequelas funcionais e alta probabilidade de óbito (44,46). Nesses eventos, os déficits podem ou não melhorar com tratamentos adequados (38). Pode-se subdividir a gravidade do AVC isquêmico de acordo com as faixas de pontuação da escala NIHSS, como descrito na Tabela 1 (38,44).

A escala mRs avalia progressivamente a incapacidade funcional dos pacientes após o AVC, desde indivíduos sem sintomas até o óbito (Tabela 1) (44). Essa escala é eficiente para determinar o volume do infarto cerebral e as sequelas funcionais após a isquemia, principalmente se associada a outras escalas (47). O mRs já foi observado como um bom preditor de custos do AVC com base na gravidade do evento, de modo que existe uma correlação linear entre ambas as características: quanto maior a gravidade do evento, maiores os custos com o paciente (48).

**Tabela 1.** Principais escalas de avaliação da gravidade do AVC e seus significados de acordo com cada pontuação. As escalas listadas são NIHSS e mRs.

<b>Escala</b>	<b>Gravidade</b>
<b>NIHSS</b>	
0	Sem sintomas
1-4	AVC leve
5-15	AVC moderado
16-20	AVC moderado a grave
21-42	AVC grave

<b>mRs</b>	
0	Sem sintomas
1	Sem incapacidade significativa, além dos déficits do AVC
2	Leve incapacidade
3	Incapacidade moderada
4	Incapacidade moderada a grave
5	Incapacidade grave
6	Óbito

O índice de Barthel, por sua vez, avalia aspectos básicos de atividades diárias, como mobilidade e auto cuidados (44,49,50). Essa escala é uma somatória de pontos com base em 10 atividades realizada pelo paciente (44). De forma regressiva, ela avalia o quão dependente o paciente é para realizar atividades comuns básicas, como alimentação, higiene pessoal e mobilidade (49,51). Um paciente com alto grau de independência nas atividades tem pontuação 100, enquanto um com alta dependência e possibilidade de óbito, apresenta pontuações menores, chegando a 0 (44,46,49). Altas pontuações de Barthel na alta hospitalar dos pacientes após o AVC são bons indicadores de redução de sequelas e bom prognóstico (46). Essa escala é muito utilizada conduzir tratamentos de reabilitação dos pacientes, de forma a aumentar a qualidade de vida dos mesmos (51). Ela também é comumente usada na avaliação dos prognósticos de pacientes em estudos clínicos de AVC (46).

Apesar de, separadamente, as escalas apresentarem boa reprodutibilidade e eficiência na predição da gravidade e prognóstico do AVC, elas avaliam condições específicas e pontuais. A utilização conjunta de duas ou mais escalas mostra um quadro geral das condições dos pacientes, desde funcional a neurológica, auxiliando a guiar terapias mais eficazes para a recuperação dos indivíduos pós AVC (44,46).

Os tratamentos para o AVC visam a redução da área de penumbra, com diminuição dos déficits neurológicos, através de mecanismos de reperfusão sanguínea (23,37). Com relação a recuperação tecidual, tempo é essencial para a eficiência dos tratamentos, de modo que apresentam melhores resultados na fase

aguda do evento (23,52). Tratamentos medicamentosos e mecânicos, como o uso de trombolíticos e trombectomia, são as principais formas de reperfusão da circulação tecidual na fase aguda do AVC, apresentando boas taxas de redução dos danos cerebrais (23,38,53). Entretanto, esses métodos possuem uma série de restrições quanto a gravidade, localização e tempo de ictus do evento (23,37).

O uso de trombolíticos na fase aguda do AVC tende a reduzir em, pelo menos, 30% os déficits nos primeiros meses após o evento (54). Esse composto deve ser aplicado nos pacientes em até 4,5 horas após o início dos sintomas (ictus), em eventos isquêmicos moderado (NIHSS  $\geq$  4) e em pacientes com idade abaixo de 75 anos (55). Essas condições são necessárias para evitar efeitos adversos, como transformações hemorrágicas pós isquemia (54,55). Mesmo seguindo todas as considerações, esse tratamento pode recanalizar apenas 50% dos vasos, o que torna essa terapia eficaz para menos de 5% dos casos (54,56,57).

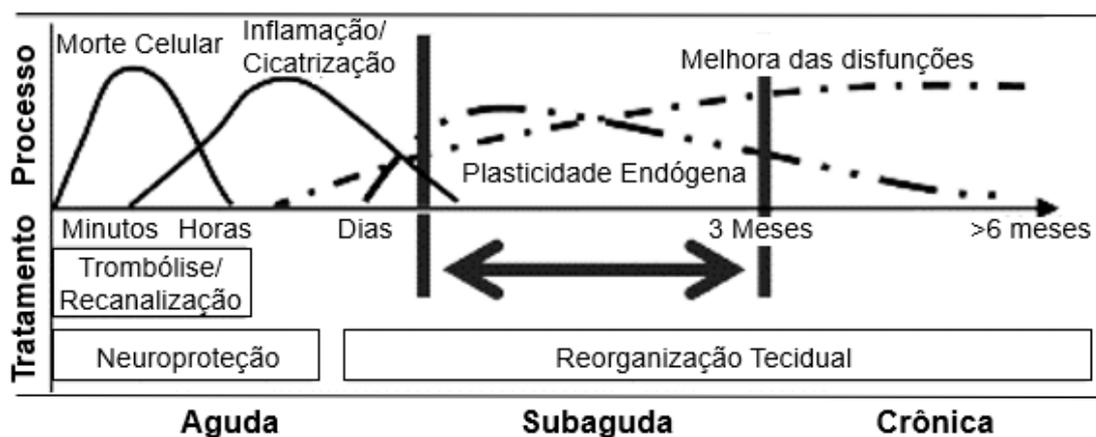
As terapias endovasculares são vantajosas sobre as trombolíticas intravenosas devido à ação local no trombo, à maior janela de terapia, que chega em até 24 horas após o ictus, às maiores velocidades e taxas de recanalização dos vasos (57). A trombectomia tende a aumentar os prognósticos favoráveis dos pacientes e a reduzir as chances de hemorragias cerebrais pós tratamento na fase aguda (57). Entretanto, essa técnica é exclusiva para lesões na artéria cerebral média, além de serem consideradas uma técnica invasiva e apresentarem maiores custos de tratamento (12,57). Apesar de novas drogas serem estudadas para a recuperação do AVC, nenhuma apresentou efeitos neuroprotetores completamente satisfatórios em humanos, de modo que são necessários estudos mais aprofundados sobre os mecanismos da doença e suas especificações (39).

Uma combinação de tratamentos na fase aguda do evento, sejam estes químicos ou mecânicos, um bom controle dos fatores de risco, e terapias de reabilitação, como fisioterapia, terapia ocupacional, fonoaudiologia e psicologia, auxiliam os pacientes a obterem melhores resultados no tratamento das sequelas a médio prazo, na fase crônica do evento (53).

A evolução do AVC envolve diversos mecanismos moleculares associados com dano e recuperação tecidual, dependendo do estágio da doença. Devido a isso, podemos separar a evolução do AVC em fases: aguda, subaguda e crônica (52). A

fase aguda, como mencionado, é o período após a oclusão dos vasos, com delimitação do core e penumbra e início dos sintomas (Figura 4). Essa fase é caracterizada pela falta de oxigenação tecidual, o que ativa processos apoptóticos, excitotóxicos e inflamatórios, com desregulações metabólicas, como favorecimento da atuação da via glicolítica anaeróbica, acúmulo de ácido láctico e diminuição do pH tecidual (37,52,58,59). Nesse estágio, tratamentos visam a neuroproteção tecidual, com a recanalização do fluxo sanguíneo (2,58). Após alguns dias do ictus do evento, inicia-se a fase subaguda, na qual ocorre a reorganização tecidual e maior eficiência na recuperação dos déficits, devido à altas taxas de plasticidade endógena e colateralidade, que visam a manutenção da pressão de perfusão cerebral (52). A partir desse momento, terapias complementares como fonoaudiologia, fisioterapia e terapia ocupacional são essenciais para uma rápida recuperação.

Após aproximadamente 3 a 6 meses do ictus do evento, inicia-se a fase crônica do AVC. Nesse estágio, os déficits estão bem delimitados e visa-se a melhora das disfunções adquiridas (Figura 4) (52).



**Figura 4.** Evolução do AVC isquêmico ao longo do tempo, descrevendo os mecanismos moleculares ativados em cada estágio da doença. Adaptado de (52).

## II. Biomarcadores Moleculares

As diferenças moleculares entre os diferentes estágios do AVC caracterizam cada fase de recuperação dos pacientes pós isquemia e podem ser reguladas por

moléculas liberadas pelas células de acordo com as condições fisiológicas do meio intra e extracelular, seja uma dieta, resposta a um tratamento ou à fisiologia de uma doença (60). Essas moléculas são conhecidas por biomarcadores e podem ser pequenos fragmentos de DNA, RNAs não codificantes (ncRNA), proteínas, lipídeos ou metabólitos (60–62). Conceitualmente, biomarcadores devem ser moléculas que possuam sensibilidade e especificidade para mudanças fisiológicas, e cuja alteração de expressão auxilie no diagnóstico, monitoramento da progressão da doença, resposta a drogas e predição de prognóstico (60,63). Desse modo, os biomarcadores podem agir como fatores independentes ao prognóstico de doenças.

Essas moléculas devem ser facilmente obtidas e quantificadas, o que prioriza a identificação de biomarcadores circulantes em biofluidos, como urina, sangue periférico (plasma e soro), saliva e líquido (64).

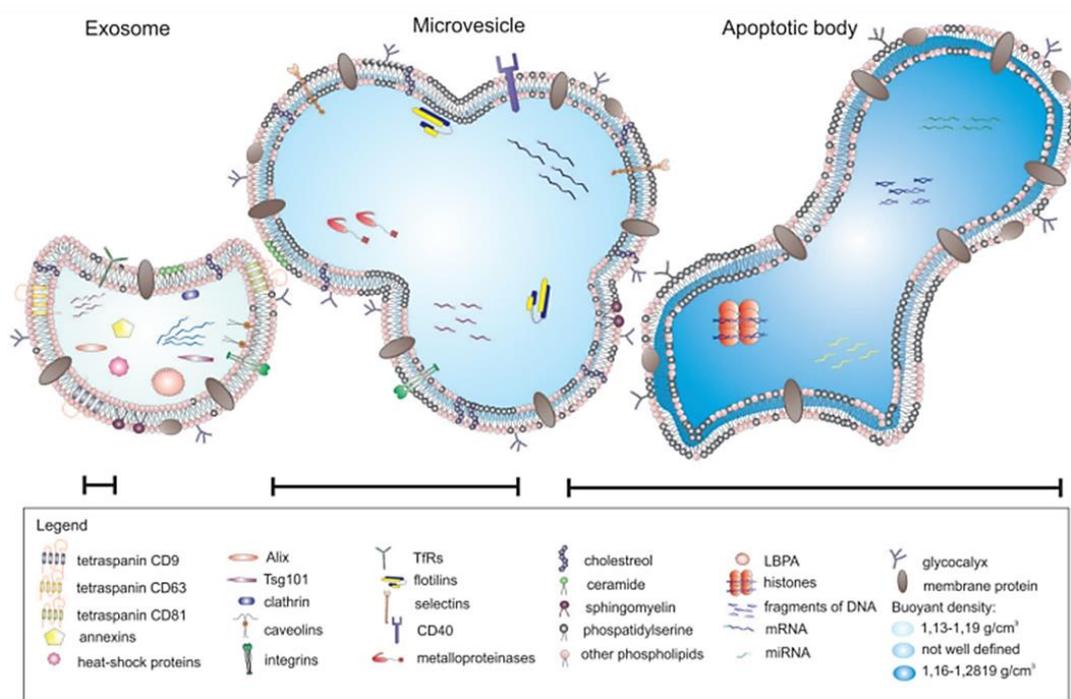
Os biomarcadores estão presentes em biofluidos quando liberados pelas células de forma passiva, como após apoptose, ou ativa, quando associados a vesículas extracelulares (EVs) (64). Quando essas moléculas se encontram interiorizadas em EV ou associadas a complexos lipoproteicos, por exemplo, elas apresentam maior estabilidade, devido a menor taxa de degradação extracelular (64). Essa proteção aumenta o efeito sistêmico dos biomarcadores circulantes.

As EVs são pequenas partículas liberadas pelas células em condições normais ou patológicas, cujas funções estão associadas à comunicação intercelular, como transferência de carga genética e receptores celulares e propriedades protetoras, modulação da resposta imune e regeneração tecidual após dano celular (65,66). Essas propriedades das EVs as têm transformado em um potencial de pesquisa e tratamento de doenças nos últimos anos.

As EVs podem ser liberadas por todos os tipos celulares e são classificadas em três tipos principais, com base em seu tamanho, conteúdo molecular e biossíntese: corpos apoptóticos, microvesículas e exossomos (Figura 5) (65,66). Os corpos apoptóticos são vesículas grandes (entre 500nm–2 µm) e irregulares formadas durante o estágio final do apoptose celular (65–67). Microvesículas apresentam tamanhos entre 100nm a 1µm e são formadas pelas células em diferentes estágios de repouso, após estresse oxidativo ou hipóxia (65). Elas são vesículas heterogêneas, formadas a partir da membrana celular através da reorganização do citoesqueleto e

fluxo de cálcio (68). Exossomos, por sua vez, são as menores vesículas, apresentando entre 30 e 100nm (69–72). Essas vesículas são formadas a partir de endossomos e corpos multivesiculares, podendo ser enviadas ao meio extracelular ou para a degradação via lisossomos (69,73).

As EVs transportam moléculas a partir de suas células de origem, atuando em diversos processos celulares tanto de forma local quanto sistêmica (65,67,68). Uma das principais vantagens desse encapsulamento molecular é a sua proteção contra degradações no meio extracelular, possibilitando um transporte intercelular mais eficaz (74).



**Figura 5.** Principais tipos de vesículas extracelulares: exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. Modificado de (63).

As EVs podem conter todos os tipos de biomarcadores, sendo que os ncRNAs são os mais estudados (74). Essas moléculas agem em diversos processos celulares, incluindo transcrição e tradução gênica (75,76). Elas podem ser classificadas de acordo com suas expressões e funções celulares: manutenção e regulação. A primeira categoria envolve os ncRNAs associados às funções basais celulares, a fim de manter sua viabilidade (76). Essas moléculas podem ser os RNAs ribossomais

(rRNA), transportadores (tRNA) e pequenos RNAs nucleares (snRNA), por exemplo (76).

Por sua vez, os ncRNAs reguladores agem de forma direta sobre a regulação da expressão gênica a níveis epigenéticos, transcricionais ou pós-traducionais (76). Dentre essa classe de ncRNA, podemos citar os pequenos RNAs de interferência (siRNA), RNAs circulares (circRNA), RNAs que interagem com o PIWI (piRNA) e microRNAs (miRNA), sendo esse último o mais frequente. Os miRNAs possuem em média 22 nucleotídeos de tamanho e já foram descritos como reguladores de diversos processos moleculares (77). Eles são expressos em todos os tipos celulares e, apesar de apresentarem uma dinâmica na sua expressão dependente da fisiologia celular e extracelular, possuem sequências conservadas entre espécies (78). Análises mostraram que os microRNAs variam os níveis de expressão entre em cada tipo celular, de modo que as cinco moléculas expressas mais abundantes representam 50% de todos os microRNAs identificados em uma amostra (78,79).

Os microRNAs participam como reguladores da expressão gênica de forma pré ou pós transcricionais. Essas moléculas podem interagir com regiões gênicas codificantes, de *splicing* alternativo ou promotoras, ou com o RNA mensageiro formado pela transcrição do gene alvo (79). Estudos mostram que as interações com os RNAs mensageiros são as mais comuns e, assim como a interação com a região gênica codificante, causam a repressão da expressão gênica (79–81). Em contrapartida, sob condições específicas, a interação dos microRNAs com a região promotora pode gerar um aumento na expressão do gene alvo (79,82). A interação microRNA-gene alvo é dinâmica, dependente das condições normais ou patológicas, e multigênica, ou seja, um microRNA pode apresentar múltiplos genes alvo (79).

Quando liberados pelas células, os microRNAs são promissores biomarcadores de doenças, sendo amplamente estudados devido a sua função como mensageiros químicos na comunicação intercelular e regulação das atividades celulares (79). A liberação dessas moléculas pelas células tem se mostrado um processo bem regulado, podendo regular funções tanto nas células alvo quanto nas células de origem (79). Além de serem encontradas em EVs, os microRNAs também foram observados associados a complexos proteicos e lipoproteicos, como à argonauta 2 (AGO2) e à lipoproteína de alta densidade (HDL) (79,83,84). Os mecanismos de preferência de liberação dos microRNAs ainda não foram

completamente elucidados, mas sugere-se que sejam dependentes do tipo celular de origem e da classe dessas moléculas (79).

Outros biomarcadores circulantes com grande interesse na fisiopatologia de doenças são os metabólitos. Eles são pequenas moléculas que geram respostas celulares a processos biológicos sob condições específicas (60). Eles podem gerar uma resposta local ou sistêmica, e são altamente reguláveis por condições ambientais ou fisiológicas, como doenças e alteração de microbiota (60). Com relação à doenças, os metabólitos são bons biomarcadores para avaliar mecanismos e progressão da doença, resposta a tratamento e toxicidade celular (60).

O perfil metabólico de um paciente pode representar, de forma dinâmica, diferentes situações fisiológicas que ocorrem durante uma doença, determinando novos mecanismos de doenças e novos alvos para tratamentos, principalmente em doenças complexas (60). Devido a sua capacidade de permear a barreira hematoencefálica, os metabólitos vêm sendo altamente estudados para melhor compreensão, diagnóstico e tratamento de doenças neurológicas (60,85,86). Contudo, considerando a alta variabilidade dessas moléculas no organismo, a descoberta e a aplicação de biomarcadores na clínica devem ser padronizadas de acordo com as comorbidades dos pacientes, tecido ou biofluido estudado e técnica de análise utilizada, visando uma redução dos erros de identificação dos metabólitos (60).

#### *i. Genética do AVC isquêmico*

Devido à alta taxa de incidência do AVC, vários estudos são realizados visando descobrir variantes que auxiliem na identificação da causa, etiologia, susceptibilidade, diagnóstico, prognóstico e tratamento da doença. Elas podem ser desde variantes genômicas, pontuais ou estruturais, a moléculas regulatórias, epigenéticas ou metabólicas.

No âmbito genômico, já foram descritas variantes estruturais e polimorfismos de única base (SNP) que afetam a probabilidade de ocorrência do AVC (3,22,87–90). Essas variantes foram descritas em estudos de genes candidatos, meta-análises e exoma. Apesar do AVC apresentar características multifatoriais, algumas condições, cuja isquemia é o principal atributo, apresentam variantes causais em único gene

(87,89). Esse é o caso das síndromes de Fabry, CADASIL, CARASIL e Moyamoya, por exemplo (87,89,91–93). Essas síndromes tendem a ser hereditárias, apesar de mutações *de novo* serem possíveis nos pacientes.

A doença de Fabry é caracterizada por uma mutação no gene codificante da enzima  $\alpha$ -galactosidase A (*GLA*), o que afeta diversos tipos celulares, causando vasculopatias e AVCs isquêmicos precoces (87,89,91). Variantes identificadas no gene *RNF213*, por sua vez, foram associadas com a susceptibilidade à doença Moyamoya (90,93). Essa doença é responsável por distúrbios no acúmulo de placa aterosclerótica nas artérias carótidas internas, aumentando as taxas de AVC isquêmico transitório (93). As síndromes de CADASIL e CARASIL são as mais comuns dentre as listadas aqui e referem-se a leucoencefalopatias (92,94). Elas são caracterizadas por mutações nos genes *NOTCH3* e *HTRA1*, respectivamente, de modo que testes moleculares já estão disponíveis para comprovação do diagnóstico dessas síndromes na clínica (89,92).

Variantes genômicas também foram associadas com aumento do risco de desenvolver AVC isquêmico através de correlações com fatores de risco e mecanismos relevante à fisiopatologia do evento. Um dos mais estudados é o gene metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*), cujas variantes 677C>T e 1298A>C estão associadas com o aumento da hiperhomocisteinemia, um importante marcador do risco para a isquemia (90,95). Outro relevante gene para a susceptibilidade ao AVC é a apolipoproteína E (*APOE*), regulador dos níveis de lipídeos e colesterol circulantes (90,96). O alelo  $\epsilon 4$  desse gene foi correlacionado com aumento do risco de AVC isquêmico, principalmente na população asiática (90,96). A variante rs1799983, presente no gene da enzima óxido nítrico sintase (*eNOS*), foi associada com aumento do risco de AVC tanto para asiáticos quanto caucasianos, desregulando as atividades vaso-protetoras celulares (90,96,97).

As variantes rs6025, presente no gene Fator V de Leiden, e rs2292661, presente no gene precursor A5 da proteína dissulfato-isomerase (*PDIA5*), foram associados com alterações nos mecanismos de coagulação sanguínea dos pacientes com AVC isquêmico (90,98,99). A variante rs6647, presente no gene inibidor de protease (*SERPINA1*), por sua vez, foi associada com regulação dos danos causados por processos inflamatórios pós isquemia (90,100)

Com relação a etiologia do AVC isquêmico, variantes nos genes histona deacetilase 9 (*HDAC9*), homodomínio empareado 2 (*PITX2*) e homeobox dedo de zinco 3 (*ZFH3*) foram descritas para AVC aterosclerótico e cardioembólico, respectivamente (87). Esses genes estão envolvidos em processos de diferenciação miogênica, fibrilação atrial e regulação epigenética da aterosclerose (87,89,90,100). Variantes presentes no cromossomo 4q25, próximas ao gene *PITX2*, também foram correlacionadas com a ocorrência de AVC isquêmico em indivíduos jovens, aumentando o risco de incidência do evento isquêmico nesses pacientes (101).

Estudos também observaram a influência de variantes genômicas na eficiência de tratamentos medicamentosos para o AVC. Variantes causais para perda de funções no gene citocromo P450 2C19 (*CYP2C19*) foram associadas com o aumento do risco de AVC para pacientes tratados com Clopidogrel (102–104). Entretanto, quando os pacientes com essas variantes foram tratados com Clopidogrel em associação com Aspirina, os riscos de desenvolver novos eventos isquêmicos foram reduzidos (105).

Apesar de algumas variantes serem observadas como candidatas para o AVC isquêmico, nenhuma conseguiu reproduzir as taxas de herdabilidade obtidas através de estudos genéticos tradicionais, realizados em gêmeos ou doenças mendelianas (106). Assim, iniciou-se uma busca pela herdabilidade não identificada (*missing heritability*) em doenças complexas, inclusive o AVC isquêmico (106,107). Ainda não foram identificadas muitas variantes relevantes para esse fator, porém, observa-se que variantes raras e de baixa frequência populacional (abaixo de 5%) possam apresentar efeitos mais significativos na herdabilidade de doenças complexas e multifatoriais (106,107).

Para biomarcadores, a grande maioria dos estudos avalia níveis alterados de moléculas circulantes em plasma e soro, devido a maior facilidade de acesso, com processos pouco invasivos aos pacientes. Dentre os biomarcadores de interesse, estudos mostram alterações nos níveis de EVs, microRNAs e metabólitos circulantes. Dentre essas, os microRNAs ainda são os mais estudados, principalmente por causa de sua expressão dinâmica e função regulatória de processos moleculares.

A função das EVs como biomarcadores da evolução de doenças foi observada inicialmente em pacientes oncológicos, porém, para AVC, elas já foram descritas com

influência em processos neuroprotetores e de neuroreabilitação em pacientes e modelos animais (74,108–115). Em estudos *in vivo*, tratamentos com EVs provenientes de células tronco mesenquimais foram descritos como agentes de redução da inflamação e aumento da angiogênese e neurogênese no cérebro de modelos animais de AVC (116,117).

Além das concentrações vesiculares, o conteúdo molecular circulante nos biofluidos é de grande interesse. Essas moléculas caracterizam diferentes estágios do AVC, permitem a identificação de novos meios diagnósticos, preditivos e tratamentos para os eventos neurovasculares (74).

Estudos *in vitro* com células tronco neurais e mesenquimais demonstram que, em condições de hipóxia, há uma redução nos níveis de mir-98-3p e um aumento nos níveis de mir-133b em exossomos provenientes desses tipos celulares, respectivamente (118,119). Essas expressões diferenciais auxiliam na recuperação tecidual após o evento isquêmico, com consequente melhora do prognóstico.

A fase aguda do AVC é uma das mais estudadas devido a sua alta potencialidade de identificar biomarcadores diagnósticos e preditores de prognóstico e tratamento para os pacientes.

Li et al (2017) identificaram diferenças nas expressões dos microRNAs exossomais mir-422a e mir-125b-2-3p nas fases aguda e subaguda do evento isquêmico em plasma de pacientes com AVC isquêmico (120). Nesse estudo, o mir-422a foi identificado como hiperexpresso na fase aguda do AVC, enquanto ambos microRNAs (mir-422a e mir-125b-2-3p) foram identificados com níveis reduzidos na fase subaguda do evento, o que os torna potenciais biomarcadores para esses estágios do AVC (120).

Os microRNAs mir-134, mir-21-5p e mir-30a-5p foram identificados com expressão diferencial nas fases aguda e hiperaguda, respectivamente, do AVC isquêmico quando comparado com controles (121,122). Nessa comparação, o mir-30a-5p foi descrito como hiperexpresso na fase hiperaguda (em até 6 horas do ictus) e hipoexpresso na fase aguda (de 1 a 7 dias após o ictus) do AVC isquêmico, demonstrando que há uma mobilidade na expressão dos miRNAs em diferentes momentos do evento, podendo esta ser associada a diferentes processos moleculares e regulatórios (121).

Outros estudos demonstraram que a redução dos níveis dos microRNAs mir-30a, mir-126, let-7b, mir-122, mir-148a, let-7i, mir-320d, let-7e e mir-4429 estavam associados com AVC isquêmico até 24 horas após o ictus do evento (84,123,124). Esses microRNAs estão associados a processos moleculares envolvidos em expressão gênica, ativação do sistema imune, trombose e sinalização celular (124).

Os tratamentos recebidos durante a fase aguda do AVC, como a trombólise, por exemplo, podem alterar o perfil de expressão dos microRNAs, permitindo a identificação de moléculas que predigam o prognóstico dos pacientes após o procedimento (125,126). Níveis elevados de mir-124, mir-125 e mir-192 estão associados com aumento da gravidade e piora do prognóstico dos pacientes com AVC isquêmico pós trombólise (125). O mir-124 é um bom preditor de mortalidade em três meses após o AVC, enquanto o mir-125 aumenta as taxas de inflamação e reduz a angiogênese em condições de privação de oxigênio (125).

O aumento do mir-122 no início dos sintomas foi associado com a redução do óxido nítrico, responsável pela cascata de inflamação pós isquemia, com consequente melhora do prognóstico em modelo animal (127). Dessa forma, o mir-122 pode ser um potencial tratamento para amenizar os efeitos do AVC isquêmico (127).

Devido à alta heterogeneidade de mecanismos ativados durante o AVC, uma diversidade de moléculas é alterada nos diferentes estágios de evolução da doença, dificultando a seleção de moléculas únicas para biomarcadores de diagnóstico, tratamento e predição (128–130).

No caso de estudos metabólicos, alguns biomarcadores foram identificados associados a fatores de risco, diferentes estágios, prognóstico, etiologias e processos moleculares alterados durante a doença (60).

Os metabólitos colina e homocisteína foram descritos como biomarcadores para estenose carotídea grave, um importante fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose (131,132). A dimetilarginina, por sua vez, foi associado positivamente com a ocorrência de AVC em pacientes jovens (133).

Para AVC isquêmico na fase aguda, Wang e colaboradores (2017) identificaram metabólitos relacionados com inflamação, estresse oxidativo, toxicidade

celular, e danos cerebrais (60,86). Altos níveis de tirosina e triptofano, em conjunto com baixos níveis de lactato, foram identificados como potenciais biomarcadores para diagnosticar a fase aguda do AVC (86). A redução dos metabólitos valina, leucina e isoleucina, conhecidos como BCAA, também foi observada em pacientes na fase aguda do AVC, quando comparada com indivíduos controles (60,85,134). Esses metabólitos influenciam o metabolismo bioenergético, podendo causar eventos com maior gravidade (85).

Um pior prognóstico dos pacientes com AVC isquêmico, com um aumento dos danos cerebrais, também foi observado com uma redução dos níveis de lisina e com um aumento nos níveis de matrix metalopeptidase 9 (MMP-9) nos pacientes (62,135). A diminuição de homoarginina nos pacientes com AVC isquêmico foi relacionada com o aumento da mortalidade pós AVC (62,136). Esse metabólito influencia a regulação do fluxo e da pressão sanguínea, do agregamento plaquetário e da viabilidade celular (62,136).

Em contrapartida, um paciente pode ter um bom prognóstico pós AVC quando apresentar o padrão de expressão metabólica: aumento nos níveis de betaína e lysoPE(18:2) e uma diminuição dos metabólitos serina, isoleucina e PC 50/50 (85). Esses metabólitos podem regular o crescimento, reparo e manutenção celular e tecidual do cérebro pós evento (85).

No caso de determinação da etiologia do AVC, níveis aumentados de lactato, piruvato, glicolato e formato, assim como níveis reduzidos de glutamina e metanol foram observados em pacientes com AVC lacunar (60,137). Esses metabólitos agem sobre o metabolismo energético anaeróbico e do ácido fólico (60,137). Para AVC aterosclerótico de grandes vasos, a presença de fosfolípídeos, como a lysofosfatidilcolina (22:6), foi observada em níveis alterados em pacientes (138). Essas moléculas possuem funções relacionadas com a estabilidade da membrana neuronal, com possíveis efeitos sobre o mecanismo inflamatórios pós AVC (60,132).

Apesar de vários estudos serem desenvolvidos na busca por biomarcadores, a dificuldade de identificar moléculas exclusivas para uma determinada doença impedem que elas sejam introduzidas na clínica de forma eficaz (60). Essa questão é ainda mais difícil para doenças complexas, como o AVC, no qual há uma alta variabilidade nas causas e nos mecanismos moleculares que ocorrem durante o

evento isquêmico (60). Uma das principais estratégias para melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia dessas doenças, assim como novos meios de diagnóstico e tratamento, é o uso de análises multiômicas, na qual ocorre uma interpretação conjunta de diferentes classes moleculares e variantes encontradas alteradas nos pacientes (60,139–141).

### III. Técnicas moleculares

#### i. Sequenciamento do Exoma

Os sequenciamentos de nova geração (NGS) têm sido cada vez mais utilizados em substituição ou complementação às técnicas tradicionais, principalmente sequenciamento por Sanger, e estudos de associação genômica (*Genome-wide association studies* – GWAS), devido a sua maior sensibilidade para identificação de variantes comuns e raras, maior praticidade em comparação com técnicas primárias de sequenciamento e seu decrescente custo (142,143). Ao contrário das técnicas tradicionais de sequenciamento e análises de GWAS, os NGS permitem uma melhor avaliação de variantes de baixa frequência populacional e a descoberta de variantes inéditas, inclusive em pequenas casuísticas (144).

Essa tecnologia tem sido utilizada para estudos em diversas doenças complexas, inclusive neurológicas, como Alzheimer, AVC, Parkinson, epilepsia, esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica (142). Dentre as várias técnicas de sequenciamento de nova geração, os sequenciamentos genômicos classificam-se entre sequenciamento do genoma completo (WGS) e do exoma (WES).

O WGS avalia todo o genoma, incluindo as regiões codificantes, não codificantes e regulatórias, além de possibilitar a investigação de variantes estruturais (145). Entretanto, apesar de apresentar dados mais completos do genoma, sua análise ainda é complexa, devido à grande quantidade de dados gerados, o que impõe a necessidade de densas técnicas de bioinformática (142,145).

A técnica de WGS tem sido sucessivamente utilizada para identificar variantes em doenças raras e complexas, já que estas não tendem a apresentar variações apenas nas regiões codificantes (142,145). As regiões não codificantes englobam sítios de *splicing* alternativos, responsáveis pela geração de proteínas alternativas,

que podem estar relacionadas à fisiopatologia da doença, além de sítios de ligação com ncRNAs, regiões regulatórias ou hipersensíveis à DNase 1, indicando regiões de maior taxa de expressão gênica (<https://www.encodeproject.org/>) (145,146). Assim, o WES permite a análise de apenas 1% do genoma, avaliando apenas as regiões que se correlacionam diretamente com a expressão proteica e os mecanismos das doenças (142). Contudo, apesar do WGS ser uma das técnicas mais eficientes para a compreensão de pacientes não diagnosticados ou de doenças ainda não totalmente esclarecidas, seu alto custo e excesso de dados gerados ainda são significantes desvantagens dessa metodologia (145).

O WES, por sua vez, surge como metodologia alternativa ao WGS, envolvendo a captura das regiões codificantes do genoma através de hibridizações do DNA genômico em sondas de oligonucleotídeos que, coletivamente, cobrem as regiões dos éxons (147). Essa técnica tem sido amplamente realizada devido a praticidade de obter apenas as regiões codificantes do genoma, que tendem a apresentar as principais variantes funcionais responsáveis pelas doenças estudadas, além da possibilidade de realizar várias amostras simultaneamente (147). Como o WES avalia apenas aproximadamente 1% do genoma, apresenta também as vantagens de ser mais econômico e ter menor quantidade de dados gerados para análise do que o WGS (142). Essa técnica tem sido utilizada para análises de doenças que segregam em loci, grandes consórcios de doenças e para validações dos resultados obtidos por WGS (147).

## ii. Sequenciamento de microRNAs

O transcriptoma pode ser descrito como o conjunto de todas as moléculas transcritas do genoma, assim como suas quantidades, em determinada fase do desenvolvimento ou condição fisiológica (146). Nessa metodologia, são analisados todos os transcritos, como RNAs mensageiros (mRNAs), RNAs não codificantes e pequenos RNAs; assim, é possível determinar o padrão de expressão gênica, sítios de *splicing* alternativos e modificações pós-transcricionais (143,148,149). O transcriptoma pode responder várias questões sobre a genética de uma doença, principalmente ao avaliar a variabilidade gerada através de codificações alternativas (146).

A técnica de microarranjos, comumente utilizada para essas análises, vem sendo substituída por sequenciamento de nova geração das moléculas de RNA (RNA-seq), graças ao desenvolvimento de novas tecnologias (143,148–150). Essa última, quando comparada com a técnica de microarranjos, proporciona algumas vantagens, como maior acurácia na medição da expressão, principalmente de transcritos com baixa expressão, maior identificação de moléculas não descritas, ausência de variabilidade das sondas de hibridação, e menor custo (148,149).

Ao se analisar apenas as porções não codificantes e regulatórias dos RNAs, permite-se obter resultados mais específicos para a pergunta de interesse. Para isso, utiliza-se técnicas de seleção das moléculas de interesse com base no tamanho e características das mesmas (151). A técnica de sequenciamento de pequenos RNAs (“*Small RNA Sequencing*”) permite a identificação de pequenas moléculas de RNA através da inserção de ligantes nas regiões 3’ e 5’ das moléculas, seguida pela amplificação das regiões (152). Essa técnica permite a identificação de microRNAs conhecidos, assim como a descoberta de novas moléculas. Além disso, possui a flexibilidade de reanálise dos dados em busca de atualizações nas anotações (152).

### *iii. Metabolômica*

A metabolômica avalia moléculas endógenas de baixo peso molecular (<1,5kDa) produzidas pelo organismo através da integração de diferentes ferramentas analíticas e estatísticas (153–156). Essa análise permite analisar o perfil metabólico quanto à presença e quantificação de substâncias em diferentes condições fisiológicas e fisiopatológicas (153–155). Esse estudo pode apresentar uma abordagem generalizada ou direcionada a um grupo de metabólitos pré-determinado, fornecendo informações relevantes para o entendimento das ações celulares e bioquímicas envolvidas com o fenótipo (157).

Devido a possibilidade de analisar diferentes amostras biológicas, desde biofluidos a tecidos, essa estratégia de análise biológica pode ser aplicada em diversas áreas que percorrem desenvolvimento de fármacos, caracterização de distúrbios metabólicos, bioquímicos, diagnóstico e prognóstico de doenças (153–155).

As principais técnicas de análise metabolômica são espectroscopia de massas (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN) (153,155). A RMN utiliza um campo

magnético para identificar os núcleos das moléculas presentes nas amostras (158,159). Um dos principais tipos de espectroscopia de RMN é a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ), também conhecida como RMN de próton, e permite a diferenciação dos diferentes hidrogênios presentes em uma molécula, ou em um conjunto delas. Cada núcleo molecular absorve energia do campo magnético em uma frequência distinta de acordo com a sua característica de densidade de elétrons (158). Essa diferença de frequência gera um deslocamento químico específico para cada grupo molecular, permitindo a identificação exclusiva de cada composto (158).

Essa técnica permite a identificação de aminoácidos, carboidratos, ácidos orgânicos e lipídeos (160,161). As principais vantagens do RMN são reprodutibilidade da análise, ausência de tratamentos ou separações cromatográficas das amostras previamente à análise, a não destruição das amostras pós análise, com a fácil semiquantificação dos compostos, e permite a identificação de novos compostos moleculares (162).

## **OBJETIVOS GERAIS**

Identificar variações moleculares associadas AVC isquêmico pela análise da contribuição de variantes genômicas raras presentes nas regiões codificantes do genoma humano, do padrão de expressão de microRNAs e de metabólitos circulantes em plasma nas fases aguda e crônica do AVC isquêmico.

### Específicos:

- I. Identificar variantes genômicas raras associadas ao AVC isquêmico através da análise do exoma total;
- II. Identificar microRNAs circulantes em plasma nas fases aguda e crônica do AVC isquêmico;
- III. Identificar metabólitos circulantes nas fases aguda e crônica do AVC isquêmico;
- IV. Analisar os achados genéticos e moleculares em relação a fase do AVC isquêmico, aguda ou crônica; e em relação ao conhecimento atual da fisiopatologia do AVC isquêmico.

# CAPÍTULO I – VARIANTES GENÔMICAS

## **1. Objetivos do Capítulo**

Identificar variantes genômicas associadas ao AVC isquêmico através do sequenciamento do exoma.

### *Específicos*

- Avaliar a contribuição de variantes genômicas raras presentes nas regiões codificantes do genoma humano em pacientes com AVC isquêmico.
- Avaliar a presença de variantes comuns presentes na casuística e associadas ao fenótipo
- Avaliar a presença de variantes patogênicas identificadas nas regiões codificantes do genoma de pacientes com AVC isquêmico

## **2. Métodos**

### *2.1. Casuística*

Para a análise de variantes genômicas através do sequenciamento total do exoma, foram analisadas 130 amostras de DNA de pacientes com AVC isquêmico. Como critérios de inclusão, foram selecionados pacientes que apresentaram AVC isquêmico com dano cerebral, comprovado em exames de neuroimagem, e idade acima de 40 anos.

As amostras de DNA foram obtidas a partir de sangue periférico e extraídas com a técnica de fenol-clorofórmio (163). As amostras foram ressuspensas em tampão de eluição e armazenadas em tubos criogênicos a -20°C.

Os pacientes foram coletados no Ambulatório de Neurovascular, no Hospital das Clínicas, UNICAMP. Todos os pacientes concordaram com a pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), aprovado pelo comitê de ética da UNICAMP (CAAE: 12112913.3.0000.5404/Parecer: 257.020).

## 2.2. Sequenciamento do Exoma

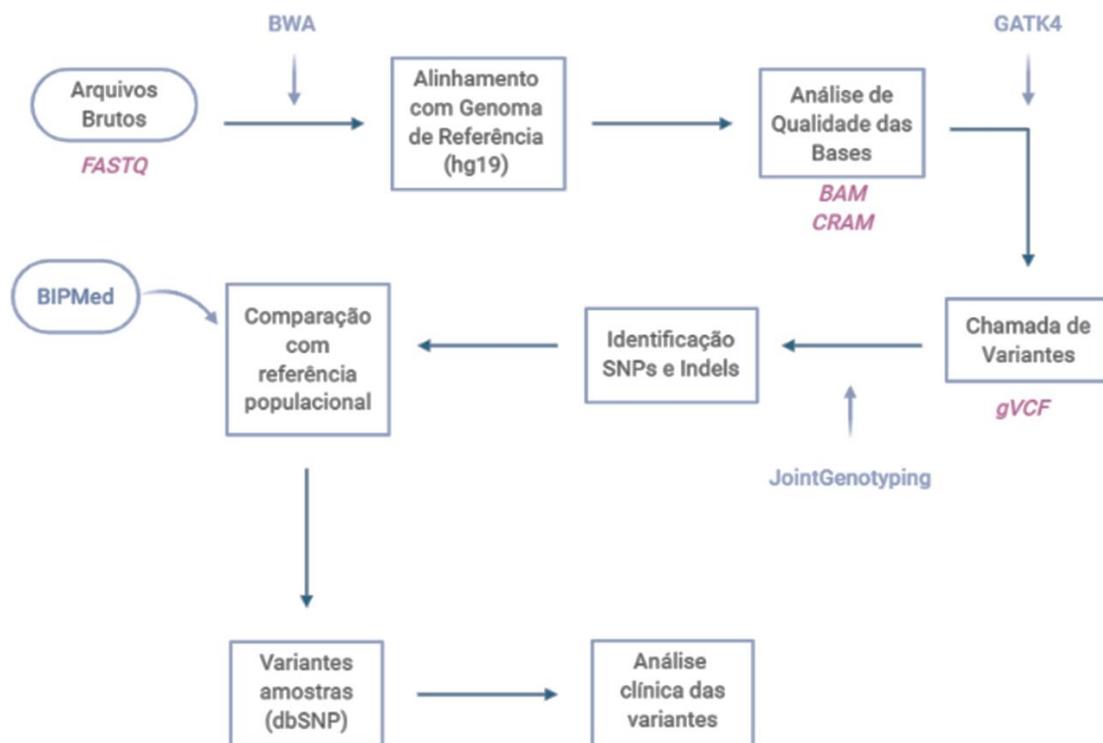
O sequenciamento do exoma consiste em três etapas: o preparo de bibliotecas, o sequenciamento dos fragmentos e a análise dos dados gerados.

Para o preparo das bibliotecas, as amostras devem apresentar uma qualidade mínima desejada, a fim de evitar erros de contaminação ou leitura dos fragmentos no sequenciador. Os parâmetros de qualidade analisados são: pureza, concentração e integridade. A pureza é analisada pela razão 280/260 por meio de técnica espectrofotométrica, no equipamento Epoch (Bioteck Inc). Essa razão deve ser entre 1,8 e 2,0 para considerar a amostra livre de contaminantes provenientes da extração. As concentrações das amostras foram medidas pela técnica de fluorescência, em equipamento Qubit (Thermo Fisher Inc), devendo apresentar concentração mínima de 50ng/µL. Por fim, a integridade das amostras foi avaliada em gel de agarose 1,5%, de modo que se deveria observar uma banda íntegra referente ao DNA genômico.

As bibliotecas de sequenciamento foram realizadas em dois lotes separadamente, utilizando os kits SureSelect V5 e V6 (Agilent Technologies), respectivamente, conforme instruções do fabricante. O sequenciamento ocorreu utilizando o kit All exon v6 (Agilent Technologies) pela plataforma Hiseq 3000/4000 (Illumina, Inc).

As amostras de sequenciamento foram processadas no Laboratório de Biologia Computacional e Bioestatística, da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, utilizando os protocolos de melhores práticas fornecidas pelo time de desenvolvimento do programa *Genome Analysis Toolkit* (GATK, Broad Institute) (Figura 6) (164,165). Os arquivos brutos (formato *FASTQ*) foram mapeados contra o genoma de referência humano, versão GRCh38, utilizando a ferramenta *Burrows-Wheeler Alignment* (BWA) (166). Os dados de alinhamento foram recalibrados pela qualidade de bases e os fragmentos mapeados são adicionados ao arquivo final (formatos *BAM* e *CRAM*) para a chamada de variantes. Essa chamada ocorre de forma individual (arquivo *gVCF*) utilizando o programa GATK4 (Broad Institute). Este arquivo final por amostra possui informações de todas as posições ao longo do genoma, mesmo que não haja variação em relação à referência. Dessa forma, é realizada uma etapa de *JointGenotyping* (167), nova chamada de variantes conjunta entre todas as amostras, visando a identificação de polimorfismos de base única (SNPs) e inserções e deleções

genômicas (*indels*). A genotipagem foi comparada com o banco de dados BIPMed (*Brazilian Initiative on Precision Medicine*, <http://bipmed.iqm.unicamp.br/genes>), a fim de calibrar esse processo de acordo com a população brasileira e evitar vícios de lote de sequenciamento (168). Seleccionamos, portanto, sítios de alta confiança para a presença de variantes, seguindo os seguintes parâmetros: genótipos com profundidade maior do que 10 e qualidade de genotipagem maior do que 20. O arquivo final das amostras (*VCF*) apresenta anotações básicas extraídas do banco de dados dbSNP.



**Figura 6.** Fluxograma de análise dos dados de sequenciamento de exoma total a partir dos dados brutos, utilizando protocolo de boas práticas do *Genome Analysis Toolkit* (GATK), do Broad Institute [2], [3]. Nas caixas detalhamos a etapa da análise dos exomas; em azul, mostramos as ferramentas utilizadas para análise; por fim, em roxo, o formato dos arquivos gerados. Criado com Biorender.com.

As variantes observadas por amostra foram analisadas no software Franklin by Genoox (<https://franklin.genoox.com>). Foram realizadas análises das variantes quanto à frequência populacional e interna à casuística, à classificação patogênica dada por estudos de associação clínica e predição *in silico* pelos softwares do Franklin by Genoox e ClinVar (169) e à presença de variantes observadas previamente como associadas a genes candidatos ao AVC isquêmico na literatura.

Inicialmente realizamos uma busca por variantes com uma alta frequência na casuística e frequência rara na população geral, observadas através dos principais bancos de dados de variantes genômicas. Em seguida, observamos as variantes comuns presentes na nossa análise e as suas influências sobre a fisiologia do AVC isquêmico.

Avaliamos, também, as variantes classificadas como patogênicas ou potencialmente patogênicas na nossa casuística, de acordo com a classificação dos principais bancos de dados de patogenicidade das variantes, na intenção de identificar variantes potencialmente causais para o fenótipo e mecanismos alterados do AVC.

Por fim, avaliamos a presença de variantes descritas previamente na literatura como associadas a genes candidatos ao AVC isquêmico, conforme descrito no item *II.i. Genética do AVC isquêmico*, da Introdução. A identificação de vias moleculares alteradas em cada uma das análises foi realizada através do software Reactome.

### 3. Resultados

#### 3.1. Casuística

As amostras foram classificadas com base em idade, sexo, fatores de risco e etiologia do AVC isquêmico (Tabela 2). A maioria dos pacientes encontra-se em investigação etiológica do AVC.

**Tabela 2.** Caracterização das amostras analisadas para o sequenciamento do exoma (%). Os dados descritos como NA referem-se à declaração do paciente como “Não sabe/Não declarou” ou à falta de informação clínica desses pacientes.

<i>Idade</i>		
Média	65	
Mediana	67	
Desvio Padrão	12,3	
<i>Sexo</i>		
Feminino	39,2	
Masculino	50,8	
NA	10	
<i>Fatores de Risco</i>		
Hipertensão	Sim	43,1
	Não	21,5

	NA	35,4
	Sim	22,3
Diabetes	Não	41,5
	NA	36,2
	Sim	18,5
Dislipidemia	Não	44,6
	NA	36,9
	Sim	10,8
Tabagismo	Não	31,5
	Ex	20,8
	NA	36,9
	Sim	9,2
Etilismo	Não	43,1
	Ex	10,8
	NA	36,9
	Sim	11,5
AVC Prévio	Não	47,7
	NA	40,8
<hr/> <i>Etiologia</i> <hr/>		
Aterosclerose		12,3
Cardioembólico		13,1
Lacunar		3,8
Outras Causas		2,3
Criptogênico		3,1
Em investigação		65,4

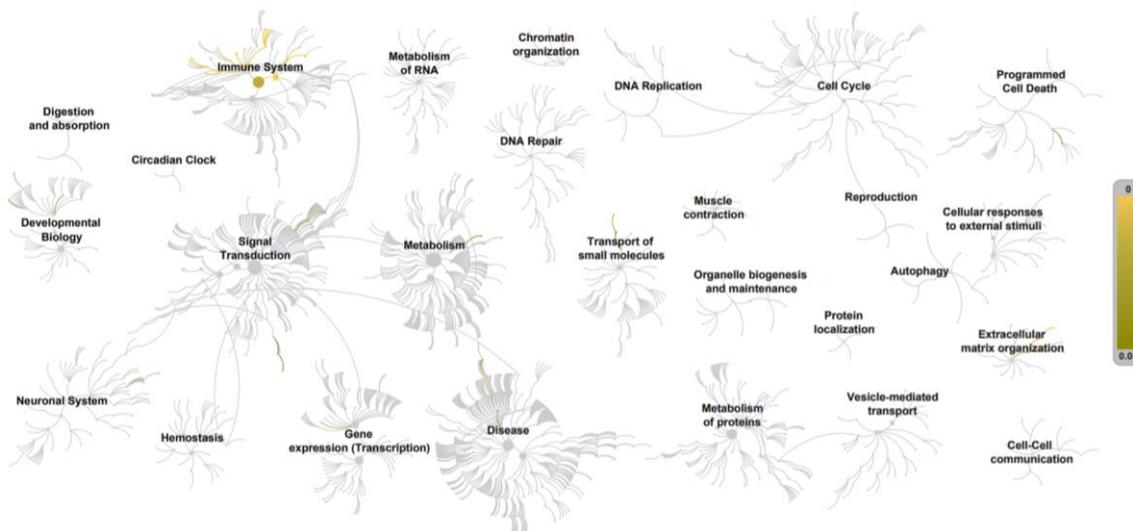
### 3.2. Sequenciamento do Exoma

A análise de frequência das variantes ocorreu com os seguintes parâmetros: foram selecionadas variantes que apresentassem alta frequência dentro da casuística, com interesse primário nas de baixa frequência populacional, seguindo para as comuns populacionalmente, de acordo com os principais bancos de dados genômicos (1000 genomes, ExAC, genomAD, UK10K), utilizado no software Franklin (Genoox, Inc).

Duas variantes foram classificadas como raras populacionalmente (frequência menor que 0,01%) e comuns à casuística (30% de casos): rs139138924 (rs55688889) e rs1811089.

Dentre as variantes comuns, foram identificadas 463 variantes com frequência interna à casuística maior do que 30% e frequência populacional menor que 80%. Esses valores de frequência foram selecionados arbitrariamente devido à alta ocorrência do AVC na população, em especial idosa. Todas essas variantes foram classificadas como benignas ou possivelmente benignas na análise.

As variantes identificadas nesse primeiro momento foram analisadas com relação às vias e processos celulares aos quais estão envolvidas. Os genes afetados por elas possuem grande influência nas vias de sistema imune, sinalização celular e transporte de pequenas moléculas (Figura 7). Dentre as vias identificadas e estatisticamente significativas (Tabela 3), podemos destacar as vias de apresentação de antígenos, sinalização do sistema imune através de interferons e citocinas, ativação de vias associadas a FGFR2, biossíntese de colágeno e apoptose. Os principais genes associados com essas vias moleculares são descritos na tabela 4.



**Figura 7** - Principais vias moleculares associadas aos genes com variantes identificadas na análise de sequenciamento de exoma dos pacientes com AVC isquêmico.

**Tabela 3** - Descrição das vias moleculares associadas aos genes com variantes identificadas na análise de sequenciamento de exoma dos pacientes com AVC isquêmico.

Nomes das Vias Moleculares	p-valor
Apresentação de antígenos: Dobragem, montagem e carregamento de peptídeo de CMH classe I	1,11E-16
Via Endossomal/Vacuolar	1,11E-16

---

Via RE-Fagossomo	1,11E-16
Apresentação cruzada e processamento de antígenos	1,11E-16
Sinalização de interferon gamma	1,11E-16
Sinalização de interferon alpha/beta	1,11E-16
Imunorregulação das interações entre células linfoides e não linfoides	6,90E-11
Geração de moléculas mensageiras secundárias	1,31E-10
Sinalização de citocinas no sistema imune	7,86E-10
Apresentação e processamento de antígenos via CMH de classe I	1,31E-7
Coestimulação pela família CD28	1,89E-7
Sistema Imune Adaptivo	1,51E-6
Sinalização de TCR	2,38E-5
Apresentação de antígenos do CMH de classe II	2,58E-5
Sinalização posterior de TCR	5,17E-5
Trimerização da cadeia de colágeno	5,58E-4
Sinalização por FGFR2 IIIa TM	0,00107
Ativação do receptor mutante FGFR2	0,00541
Ativação e Ligação do ligante FGFR2	0,00963
Biossíntese de colágeno e modificação enzimática	0,01102
Via transcricional Notch-HLH	0,01234
Canais TRP	0,0155
Cascata PI3K:FGFR2	0,01725
Sinalização por FGFR2 em doenças	0,01780
Formação de colágeno	0,01828
Montagem de fibrilas de colágeno e outras estruturas multiméricas	0,02029
Cascata mediada por SHC:FGFR2	0,02111
Sinalização FGFR2 mediada por FRS	0,02322
Sinalização por NCAM para crescimento de neurites	0,02444
Sinalização por FGFR em doenças	0,0321
Clivagem apoptótica de proteínas celulares	0,0329
Expressão de genes metabólicos ativada por ChREBP	0,03307

---

Ativação de PKA na sinalização de glucagon	0,03672
Ativação de PKA	0,03672
Cascata do PI3K	0,03757
Canais de detecção de estímulos	0,03776
Sinalização por mutantes de amplificação FGFR2	0,0400
Regulação negativa da sinalização de FGFR2	0,04155
Sinalização posterior da ativação de FGFR2	0,0447

**Tabela 4** – Lista das variantes associadas com as principais vias moleculares identificadas no sequenciamento do exoma para pacientes com AVC isquêmico (Tabela 2).

Gene	Gene	SNP	Nucleotídeo
Acetil-coenzima A carboxilase beta	<i>ACACB</i>	rs2075259	c.6046-28A>G
Proteína quinase serina/treonina RAC-beta	<i>AKT2</i>	rs2304189	c.832-28A>G
Regulador APC da via de sinalização WNT	<i>APC</i>	rs459552	c.5465T>A
Proteína precursora da beta amiloide	<i>APP</i>	rs440666	c.1459-106A>G
Ativador BCR de GTPase e RhoGEF	<i>BCR</i>	rs4822371	c.1279+16183A>G
Colágeno tipo 27 cadeia alfa 1	<i>COL27A1</i>	rs2636866	c.3609+35C>T
Colágeno tipo 4 cadeia alfa 3	<i>COL4A3</i>	rs7579991	c.145-99C>T
Receptor do fator de crescimento de fibroblastos 2	<i>FGFR2</i>	rs1047100	c.696A>G
Histona deacetilase 10	<i>HDAC10</i>	rs13058062	c.1834-40A>G

Domínio HECT e RDL contendo proteína ligase ubiquitina E3, membro 1 da família	<i>HERC1</i>	rs2255243 rs2228511 rs2229749 rs10851731	c.5087G>C c.9093G>A c.11166G>C c.12879A>T
Complexo de maior histocompatibilidade, classe IB	<i>HLA-B</i>	rs1050458 rs9266206 rs9266196 rs9266197	c.11T>C c.5T>G c.73+34C>G c.73+33C>T
Complexo de maior histocompatibilidade, classe II, DM Beta	<i>HLA-DMB</i>	rs1042337	c.590C>T
Complexo de maior histocompatibilidade, classe II, DR Beta1	<i>HLA-DRB1</i>	rs1064697	c.*40G>A
Dedo Anelar 1 de Mahogunin	<i>MGRN1</i>	rs3747587	c.-8C>G
Miosina IXB	<i>MYO9B</i>	rs2279003 rs4808072	c.3795T>C c.2689-26T>C
Proteína quinase cAMP dependente, tipo I, subunidade alfa regulatória	<i>PRKAR1A</i>	rs2302230 rs2302231	c.770-24G>A c.892-34G>T
Receptor de Rianodina 2	<i>RYR2</i>	rs2253831	c.11326-23C>T
Transportador de esfingolípídeo 1	<i>SPNS1</i>	rs7140 rs6565300	c.*137C>A c.809+113A>C
Potencial receptor transiente do canal de cátions da subfamília M, membro 2	<i>TRPM2</i>	rs1785436 rs1785437 rs1614122	c.1933-10T>C c.2538+14C>T c.2790+55G>A

Foi realizada uma análise quanto à classificação patogênica das variantes software Franklin (uma associação entre a comunidade científica, ClinVar e PolyPhen), independente de frequência populacional. Observamos 60 variantes com essa classificação, dentre as quais podemos destacar as presentes nos genes descritos na tabela 5. Essa seleção ocorreu com base nas descrições da literatura relacionadas com a fisiopatologia do AVC isquêmico. Todas as variantes apresentam baixa frequência populacional.

Essas variantes apresentam relações com vias moleculares associadas a sinalização celular, transporte de pequenas moléculas e homeostase celular (Figura 8).

**Tabela 5** - Variantes gênicas classificadas como patogênicas ou potencialmente patogênicas observadas no sequenciamento do exoma de pacientes com AVC isquêmico. (NA) = não informado

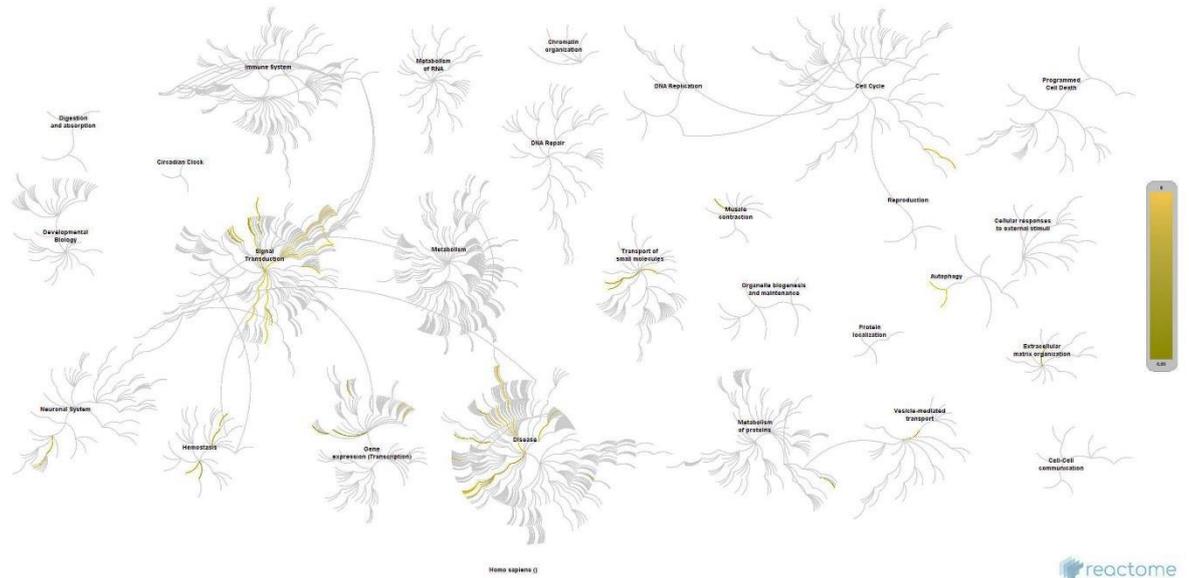
Gene	Símbolo	Variante	Frequência (%)
DNA polymerase gamma, subunidade catalítica	<i>POLG</i>	rs368435864	<0,01
GTP ciclo-hidrolase 1	<i>GCH1</i>	rs41298442	0,04
Subunidade Beta da Hemoglobina	<i>HBB</i>	rs11549407	0,03
Molécula de sinalização sônica hedgehog	<i>SHH</i>	rs1162576975	<0,01
Cadeia pesada da miosina 7	<i>MYH7</i>	rs45464193	0,01
Colágeno VI alfa 3	<i>COL6A3</i>	rs148175795	0,01
Proteína do dedo anelar 213	<i>RNF213</i>	rs200625556	0,07
Regulador de condutância transmembranar da fibrose cística	<i>CFTR</i>	rs397508791	NA
Receptor 3 do gene NOTCH	<i>NOTCH3</i>	rs373181668	<0,01
Fator de coagulação VIII	<i>FVIII</i>	rs137852388	0,02
Subfamília C do cassete de ligação a ATP 6	<i>ABCC6</i>	rs41278174	2,05
Plasminogênio	<i>PLG</i>	rs73015965	0,29
Regulador do ferro homeostático	<i>HFE</i>	rs1800562	3,38

Receptor 2 do fator de crescimento  
de fibroblastos

*FGFR2*

rs748777325

0,01



**Figura 8** - Vias moleculares alteradas com as variantes gênicas patogênicas e potencialmente patogênicas identificadas no sequenciamento do exoma de pacientes com AVC isquêmico (tabela 4).

Também buscamos por variantes descritas previamente na literatura para o AVC isquêmico, porém, nenhuma foi identificada na nossa casuística.

#### 4. Discussão

Na análise de sequenciamento de exoma dos pacientes com AVC isquêmico visamos na seleção de variantes raras populacionalmente, ou seja, com frequência menor que 1%, porém, frequentes na nossa casuística. Isso porque o AVC é um doença complexa e multifatorial, na qual há uma significativa influência de variantes raras com efeito poligênico (107).

Com isso, identificamos duas variantes com frequência interna de 30%: rs139138924 (rs55688889) e rs1811089. Esta última está presente na região do cromossomo 7p12, porém, não apresentou nenhuma descrição na literatura.

A variante rs139138924 foi identificada como rara na população geral e uma das mais frequentes na nossa casuística, encontrando-se na região intrônica do gene da

protease específica de ubiquitina 7 (*USP7*), responsável por modificações pós traducionais na manutenção da estabilidade do genoma nas células (170). A expressão gênica do *USP7* é considerada essencial às funções celulares e alterações podem ser responsáveis pela desregulação de diversos mecanismos moleculares e contribuindo para a fisiopatologia de doenças, como o câncer ou síndromes neurodegenerativas (170,171). Variantes nesse gene influenciam na regulação do ciclo, replicação e mitose celular, além de estabilidade de telômeros, apoptose e resposta ao dano do DNA (170).

Variantes com alta frequência na população e na casuística também foram observadas. Considerando a alta frequência do AVC na população mundial, especialmente idosa, devemos ressaltar a comparação das variantes genômicas com bancos de dados específicos com controle de idade e fatores de risco a fim de garantir que as variantes identificadas não sejam enviesadamente analisadas e interpretadas. Apesar de termos comparado as variantes quanto à frequência nos principais bancos de dados genômicos internacionais, o uso do banco de dados da população brasileira, BIPMed, auxiliou na identificação de variantes de acordo com a frequência na população brasileira.

Nessa análise identificamos variantes em importantes genes associados com a fisiopatologia do AVC, incluindo os genes de colágeno, kinases, receptores de fibroblastos e deacetilase de histonas.

Os genes da família do antígeno de leucócitos humanos (*HLA*) já foram descritos com associação ao AVC isquêmico, incluindo em crianças (172–176). Haplótipos do gene *HLA-B* foram descritos como mais prevalentes em pacientes com AVC isquêmico quando comparados com controles, simbolizando um aumento do risco para desenvolvimento da doença (176). A função do gene *HLA* associa-se com diversos processos inflamatórios, através da regulação de células T e *Natural Killers*, com consequente envolvimento na susceptibilidade aos danos pós AVC isquêmico (172).

Variantes no gene do colágeno tipo 4 alfa 3 (*COL4A3*), foram descritos como potencialmente causais para dissecação de artérias cervicais, um relevante fator de risco para AVC (177). O colágeno integra a matriz extracelular, responsável pela sinalização e adesão celular (178). Mutações no colágeno IV foram descritas como

causais para AVC isquêmico em indivíduos jovens, porém sua influência na gravidade do evento ou recuperação pós AVC ainda é controverso (178–180). O colágeno também é relevante para a adesão plaquetária e inflamação nos processos isquêmicos, estando associado com o prognóstico do evento (181,182). O polimorfismo rs4103, presente no gene *COL4A2*, foi significativamente associado com a etiologia lacunar nos pacientes com AVC isquêmico na China (183).

Outro gene de interesse para doenças neurológicas é o *APP*, descrito, principalmente, com alta relação à fisiologia da doença de Alzheimer (184–186). Apesar da função gênica ainda não estar completamente elucidada, estudos mostram que diferentes clivagens proteicas da APP podem apresentar efeitos diversos na fisiologia de doenças, tanto protetores quanto danosos (187,188). De forma geral, a proteína beta amiloide se deposita no tecido cerebral após danos à barreira hematoencefálica e aumento de citocinas inflamatórias no tecido cerebral, privilegiando a forma  $\beta$  da proteína APP ( $A\beta$ ) (189–191). Com isso, ocorre o aumento do processo inflamatório e danos teciduais, incluindo estresse oxidativo, alterações no metabolismo energético e apoptose (187,192).

Em contrapartida, evidências vem demonstrando uma função neuroprotetora de fragmentos  $\alpha$  da proteína APP em condições de estresse tecidual, como hipóxia, isquemia ou danos traumáticos, de forma a regular a integridade celular pela manutenção dos canais de cálcio, receptores de glutamato e redes de regulação da expressão gênica (186,187). Esses fragmentos regulam a excitotoxicidade gerada pela  $A\beta$  e os níveis de cálcio intracelular pelos receptores NMDA, reduzindo as taxas de apoptose, estimulando a neurogênese e proliferação celular, o que auxilia na neuroproteção e manutenção das funções cognitivas pós isquemia (187).

Hipotetiza-se, portanto, que essas variantes possam influenciar a ocorrência do AVC, gravidade do evento, taxas de apoptose e a resposta inflamatória após o evento isquêmico.

Apesar de serem classificadas como benignas ou sem grandes efeitos patogênicos, uma expressão conjunta dessas variantes pode gerar implicações fenotípicas consideráveis na predisposição ao AVC. Isso pode ser simbolizado pela análise de vias moleculares afetadas pelos genes de interesse. Dentre as principais, observa-se a classe de vias do sistema imune, como apresentação de antígenos e

sinalização por interferons e citocinas. Essas vias são importantes para a manutenção do dano cerebral pós AVC, sendo significativas para a predição de prognóstico e tratamento dos pacientes (193,194).

Analizamos, também, a presença de variantes consideradas patogênicas nos bancos de dados e presentes na nossa casuística. Apesar da baixa frequência em ambos os grupos, foram identificados genes de grande interesse ao AVC, como o *NOTCH3*, *FGFR2*, *FVIII*, *COL6A3* e *PLG*.

Apesar de ser amplamente influente no fenótipo de CADASIL, a família do gene *NOTCH* possui funções associadas à sinalização e morte neuronal após o AVC (195). Além disso, variantes no *NOTCH3* foram descritas como importantes colaboradores para o desenvolvimento do AVC e pequenas hipertensões cerebrais na população idosa europeia e tailandesa (196,197). Nenhum dos pacientes da casuística apresentaram diagnóstico suspeito ou confirmado de CADASIL.

Receptores de fibroblastos já foram descritos na literatura com efeitos na manutenção da integridade vascular e permeabilidade da barreira hematoencefálica (198). O gene *FGFR2* já foi correlacionado com diferenciações celulares e manutenção da mielina no tecido cerebral (199).

Níveis elevados de *FVIII* foram observados em pacientes com AVC isquêmico, quando comparado com indivíduos controles (200,201). Esse aumento da proteína FVIII foi associado com piora do evento isquêmico e dos danos neurológicos dos pacientes, sendo encontrado, especialmente, em pacientes com AVC cardioembólico (200,201).

Os tratamentos na fase aguda do AVC envolvem o uso de ativadores de plasminogênio para controle dos danos teciduais após isquemia (202,203). Esse gene influencia a recuperação neuronal e homeostase vascular, contudo, Draxler e colaboradores (2019) identificaram que houve uma redução da resposta imune pós AVC em modelos animais após tratamento com plasminogênio, em especial os que não tiveram recanalização vascular após tratamento (202–204) .

A presença de variantes patogênicas nesses genes pode alterar as suas funções básicas, interferindo na tradução proteica e influenciando a recuperação dos pacientes após o AVC. Quanto à análise do efeito conjunto dessas variantes, realizamos uma

análise de redes de vias moleculares, que mostrou que a grande maioria das vias afetadas por esses genes pertencem ao grupo de tradução de sinal, o que pode influenciar a gravidade e prognóstico do evento (195,205–207).

Outro ponto a se considerar é a influência conjunta dessas variantes, principalmente as de baixa frequência populacional, e das vias moleculares enriquecidas identificadas na análise na herdabilidade não identificada (208). Apesar de necessitar de estudos mais aprofundados, e provavelmente com uma maior casuística, discussões recentes mostram que variantes raras e de baixa frequência podem apresentar efeitos mais significativos para explicar essa herdabilidade do que variantes dadas como comuns à população (106).

Apesar de identificarmos variantes em genes com potencial interesse para o AVC, estudos mais aprofundados ainda são necessários para a comprovação da sua influência no fenótipo dos pacientes, assim como poder preditivo para a incidência do evento isquêmico.

## **5. Considerações Finais**

Nessa análise, identificamos variantes em genes de interesse para o AVC isquêmico, em especial, os genes *COL4A3*, *COL6A3*, *FGFR2*, *FVIII*, *HLA-B*, envolvidos nos processos de biossíntese de colágeno, coagulação sanguínea, modificações pós-traducionais, inflamação, angiogênese e integridade vascular. Uma análise de rede mostrou que esses genes se encontram relacionados com vias do sistema imune e sinalização celular, que podem alterar o fenótipo e prognóstico dos pacientes pós AVC. Assim, as variantes identificadas são potenciais alvos para a investigação das suas contribuições para a predição de riscos e para o desenvolvimento de estratégias de prevenção primária e secundária dos pacientes com AVC isquêmico.

## CAPÍTULO II – RNAS NÃO CODIFICANTES

### Seção 1. Sequenciamento de microRNAs de Plasma Total

#### 1. Objetivos da Seção

Determinar o padrão de expressão de microRNAs circulantes em pacientes com AVC isquêmico, nas fases aguda e crônica da doença.

##### *Específicos*

- i. Determinar o padrão de expressão de microRNAs circulantes em plasma de pacientes com AVC isquêmico que ajam como biomarcadores para a fase aguda do evento;
- ii. Determinar o padrão de expressão de microRNAs circulantes em plasma de pacientes com AVC isquêmico que ajam como biomarcadores para a fase crônica do evento;
- iii. Comparar os microRNAs identificados em cada estágio do AVC isquêmico com a fisiopatologia da doença, visando identificar potenciais vias e mecanismos alterados.

#### 2. Métodos

##### *2.1. Casuística*

Para a análise dos microRNAs presentes nos pacientes com AVC isquêmico, foram sequenciadas 154 amostras de plasma de pacientes e controles. Dentre essas amostras, 40 amostras são de pacientes com AVC isquêmico em fase aguda, 61 amostras são de pacientes com AVC isquêmico em fase crônica e 53 são indivíduos que não apresentaram nenhum tipo de AVC ou dano neurológico até o momento da coleta de sangue. Os pacientes em fase aguda tiveram o sangue periférico coletado em até 24 horas após o início dos sintomas, enquanto os pacientes em fase crônica tiveram as amostras de sangue coletadas entre três e doze meses após o ictus. Apesar dos indivíduos controles serem diagnosticados com hipertensão, um dos principais fatores de risco para o AVC, vários exames, inclusive ressonância

magnética e doppler, comprovaram que eles não possuem nenhum tipo de alteração neurológica ou placas ateroscleróticas nas carótidas. Os diagnósticos de AVC foram realizados pela equipe médica responsável, sendo comprovados através de exames de tomografia, ressonância magnética e doppler de carótidas.

Todas as amostras foram coletadas no Hospital das Clínicas da UNICAMP, de modo que os pacientes em fase aguda foram coletados na Unidade de Emergência Referenciada (UER) do Hospital, enquanto os pacientes em fase crônica e os indivíduos controles, foram coletados ambulatorialmente, nos ambulatórios de neurovascular e de hipertensão, respectivamente. Todos os pacientes concordaram com a pesquisa e assinaram o TCLE, aprovado pelo comitê de ética da UNICAMP (CAAE: 12112913.3.0000.5404/Parecer: 257.020).

As amostras de sangue foram mantidas em gelo por até 2 horas após a coleta, a fim de preservar as moléculas circulantes de interesse (209). Foram então processadas via centrifugação por 10 minutos a 2500rpm a 4°C (163). O plasma foi separado dos leucócitos, alíquotado em microtubos de 1,5mL e armazenados a -80°C até o momento de uso. O nível de hemólise dessas amostras foi avaliado através da medida de absorbância da hemoglobina em 414nm pelo equipamento Epoch (Biotec Inc) (210,211). Essa é uma análise importante para avaliar o nível de integridade das células e, conseqüentemente, degradação das moléculas (212,213). Níveis aceitáveis de hemólise, sem comprometimentos com a qualidade das amostras, devem ter absorbância menor do que 0,2.

Os pacientes e controles avaliados nessa casuística foram comparados quanto às características clínicas relevantes para o AVC, como idade, sexo, etiologia da doença, taxa de trombólise na fase aguda e principais fatores de risco. Os dados foram comparados estatisticamente através de testes T e de ANOVA e corrigidos por múltiplos testes.

## *2.2. Sequenciamento de microRNAs*

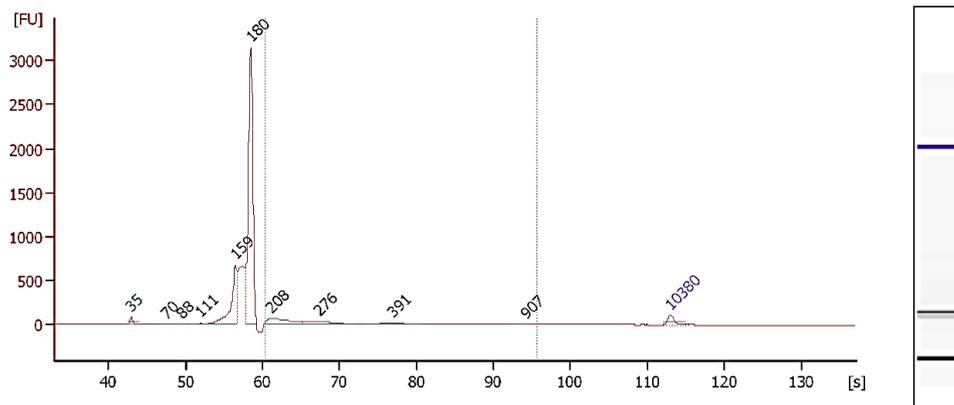
Para evitar abruptas alterações de temperatura, e conseqüente degradação das moléculas de interesse, as amostras de plasma foram descongeladas em gelo no momento do uso. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 2000rpm a 4°C

para precipitação de grandes moléculas e resíduos celulares restantes. O sobrenadante foi utilizado para as extrações de RNA.

O RNA total do plasma foi extraído através do kit mirvana Paris (Thermo Fischer Inc). Uma padronização foi feita nessa etapa a fim de aumentar a concentração de RNAs eluídos ao final do processo. Assim, iniciamos a extração com 1350 $\mu$ L de plasma, com eluição final dos RNAs totais em 35 $\mu$ L de água.

As bibliotecas de sequenciamento para pequenos RNAs foram realizadas a partir do kit Qiaseq miRNASeq (Qiagen, Inc), sob padronização de protocolo para as amostras de plasma. Utilizamos um volume inicial de amostras de RNA total de 10 $\mu$ L, e reduzimos o volume de adaptadores 5' e 3' pela metade do descrito no protocolo. Assim, reduzimos o excesso de adaptadores nas bibliotecas para obter um melhor resultado de sequenciamento. Durante o preparo da biblioteca, cada amostra recebeu um identificador (Índex) único, que permitiu que elas fossem agrupadas e não perdessem sua identidade. As bibliotecas foram unidas em conjuntos com 36 amostras cada, de modo que houvesse apenas um índex de mesmo tipo por grupo.

As bibliotecas tiveram suas qualidades verificadas através de quantificação por Qubit (Thermo Fischer, Inc) e PCR quantitativo, utilizando o kit Kapa Library Quantification (Roche Sequencing, Inc). A integridade das bibliotecas, incluindo o tamanho dos fragmentos foi analisada por bioanalyzer, com o chip DNA High Sensitivity (Agilent Technologies, Inc). As bibliotecas devem apresentar fragmentos de 180pb, aproximadamente, e concentração mínima de 5nM (Figura 9). A concentração mínima é necessária para se garantir que todas as amostras possam ser diluídas e desnaturadas equivalentemente, conforme protocolo.



**Figura 9** - Corrida de Bioanalyzer mostrando a integridade, concentração e tamanho das bibliotecas de RNA-Seq. O tamanho das bibliotecas de microRNAs deve ser de 180pb. O pico de 159pb refere-se aos picos de adaptadores da biblioteca.

Elas foram, então, sequenciadas em equipamento HiSeq 2500 (Illumina, Inc), em corrida *single end* com 50 ciclos, conforme protocolo. Em cada *lane* do sequenciador foi sequenciado um conjunto com 36 bibliotecas, previamente preparado.

### 2.3. Análise dos Dados

Os dados brutos foram demultiplexados utilizando o programa *bcl2fastq* (Illumina, Inc). Então, o processamento dos dados ocorreu através do programa *TrimGalore* (The Babraham Bioinformatics), no qual houve a seleção e corte das regiões dos adaptadores das bibliotecas e a filtragem do tamanho dos fragmentos entre 18 e 25 pares de base.

Os fragmentos foram alinhados com o genoma de referência, versão GRCh38, utilizando a ferramenta *Burrows-Wheeler Alignment* (BWA) (166). A contagem dos miRNAs maduros ocorreu pelo programa *featureCounts*, com base no banco de dados *miRBase*, v22 (214–218).

As contagens dos miRNAs maduros conhecidos foram realizadas nos softwares R e *DeSeq2* (219,220). Com a finalidade de evitar resultados falso-positivos, utilizamos alguns filtros de análise. O primeiro, um filtro de tamanho das bibliotecas. Neste, bibliotecas que apresentaram uma quantidade de *reads* menor que 100000 (um milhão) foram excluídas da análise. Em seguida, foi utilizado um segundo filtro,

removendo os miRNAs que apresentassem baixa contagem com relação ao total das amostras. Assim, as amostras estavam aptas para as etapas seguintes de comparação e normalização dos dados. A normalização dos dados ocorreu no software DeSeq2 baseada no tamanho das bibliotecas. Para comparações entre os grupos, foram realizados testes estatísticos para cada miRNA identificado. Os valores de p-valor foram corrigidos para múltiplos testes por meio do teste Benjamini-Hochberg (221). Em seguida, os miRNAs que apresentaram um valor de p ajustado menor que 0,05 foram selecionados para as análises de relevância biológica.

A construção das redes de interação foi realizada através do software mirnet 2.0 (<https://www.mirnet.ca/>) (222). Foram verificadas as interações entre microRNAs e genes alvo e as principais vias moleculares enriquecidas nas comparações. As vias foram selecionadas com base na significância estatística ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ).

### **3. Resultados**

#### *3.1. Casuística*

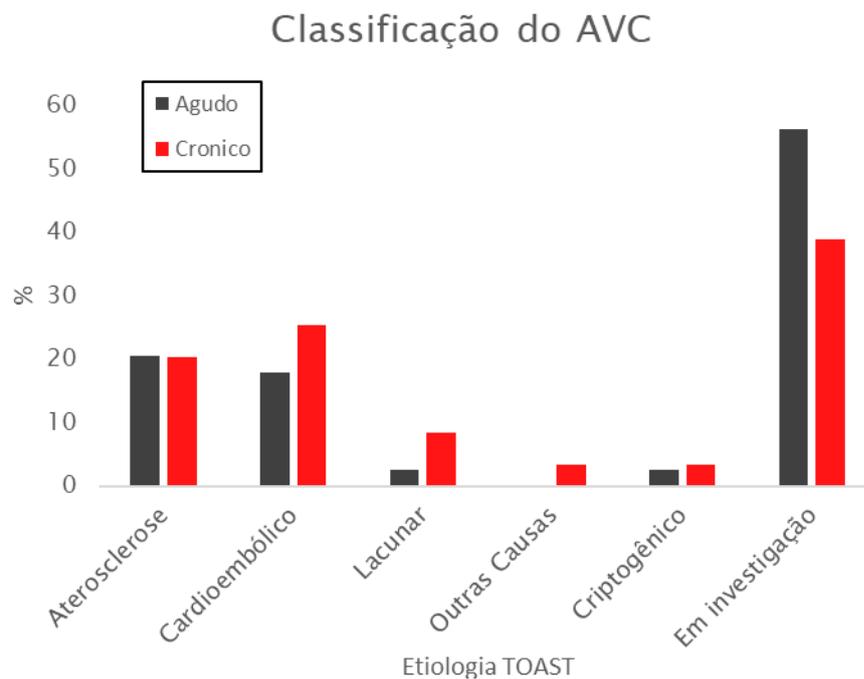
Os grupos de pacientes de fases aguda e crônica e grupo controle foram comparados quanto à idade, sexo, etnia e fatores de risco, visando a comprovação de similaridade estatística entre os grupos. Como mostrado na tabela 6, todas as condições analisadas não são estatisticamente diferentes.

Os pacientes foram comparados quanto à etiologia do AVC. Infelizmente, a maioria dos pacientes ainda se encontra em processo de investigação diagnóstica, seja em acompanhamento ativo ou não, no ambulatório de Neurovascular, do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

Os principais subtipos de AVC isquêmico identificados na nossa casuística são aterosclerose de grandes artérias e cardioembólico, tanto para a fase aguda quanto crônica do AVC. Em ambos os grupos, cada uma dessas etiologias representa aproximadamente 20% da casuística (Figura 10).

**Tabela 6.** Descrição das principais comorbidades da casuística (%).

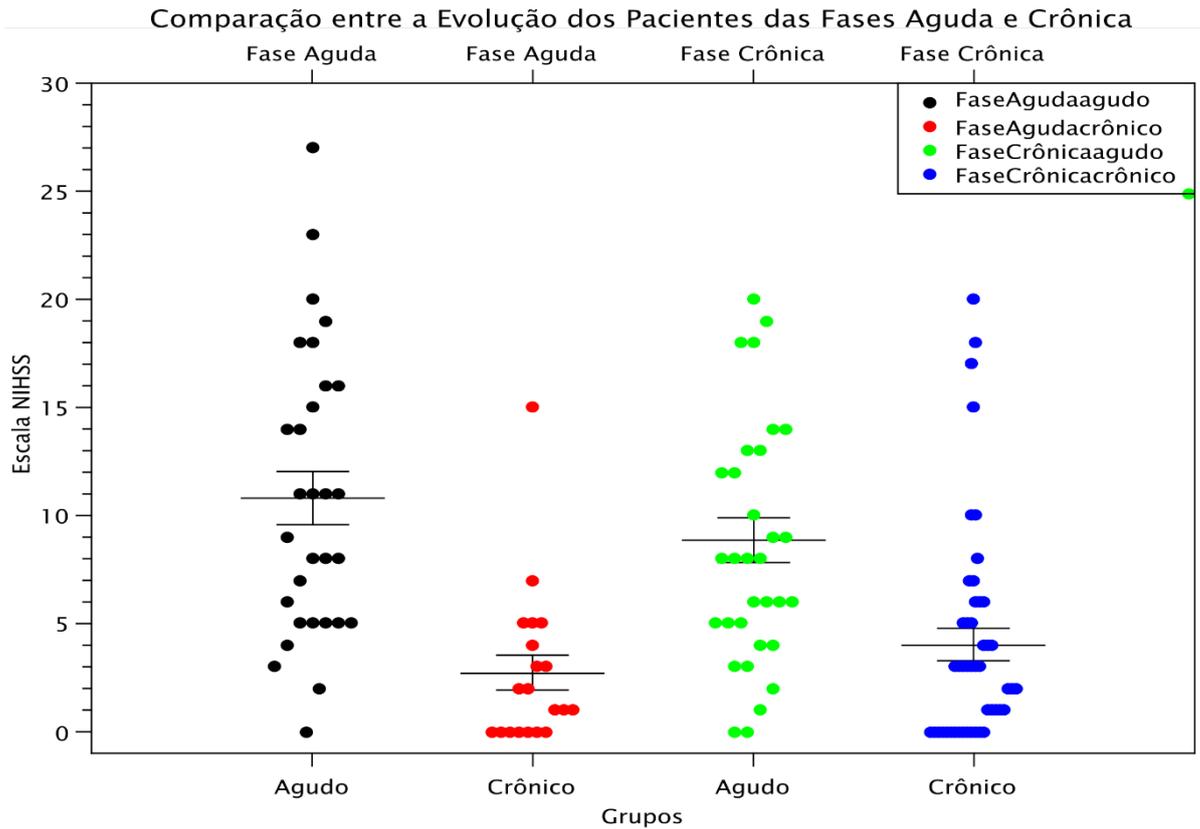
		<b>Agudo</b>	<b>Crônico</b>	<b>Controle</b>	<b>p-valor</b>
<i>Idade</i>					
	Média	65,42	63,26	62,12	
	Mediana	67	66	63	0,37
	Desvio padrão	13,72	10,80	8,84	
<i>Sexo</i>					
	Feminino	45	39	64	
	Masculino	52,5	56	36	0,503
	NA	2,5	5	0	
<i>Fatores de Risco</i>					
HAS	sim	55	56	100	
	não	20	24	0	0,55
	NA	25	20	0	
Diabetes	sim	25	28	45	
	não	45	47	51	0,69
	NA	30	25	4	
Dislipidemia	sim	22	23	66	
	não	40	46	30	0,73
	NA	38	31	4	
Tabagismo	sim	10	15	45	
	ex	20	23	0	0,71
	não	33	38	49	
Etilismo	NA	37	24	6	
	sim	7	15	2	
	ex	5	11	0	0,5
Estenose Carotídea	Não	45	48	9	
	NA	43	26	89	
	sim	10	16	0	0,83
FA	não	35	0	100	
	NA	55	84	0	0,66
	sim	12	10	0	
<i>Trombólise</i>					
	sim	25	20	0	
	não	33	38	0	0,4
	NA	42	42	0	



**Figura 10.** Classificação do AVC nas fases aguda e crônica da casuística.

A gravidade do evento e a taxa de recuperação dos pacientes foram avaliadas com base nas escalas de NIHSS, mRs e Índice de Barthel. A primeira comparação realizada foi com relação à gravidade do evento e danos neurológicos dos pacientes, através da escala de NIHSS. Na figura 11, podemos observar a evolução do evento dos pacientes dos grupos de fase aguda e fase crônica. As comparações ocorreram de forma interna aos pacientes de cada grupo, acompanhando a sua evolução clínica.

Para a casuística da fase aguda, comparamos a evolução desses pacientes na fase aguda e na fase crônica, nos casos em que houve o retorno ao ambulatório. É possível observar uma considerável redução da escala NIHSS entre os dois estágios da doença, simbolizando uma melhora dos déficits pós AVC. Essa redução da escala NIHSS é significativamente diferente entre as comparações ( $p$ -valor=4,72E-06). Esses valores podem não apresentar dados de alta confiabilidade, já que 35% da casuística não teve NIHSS calculado para a fase crônica do AVC.

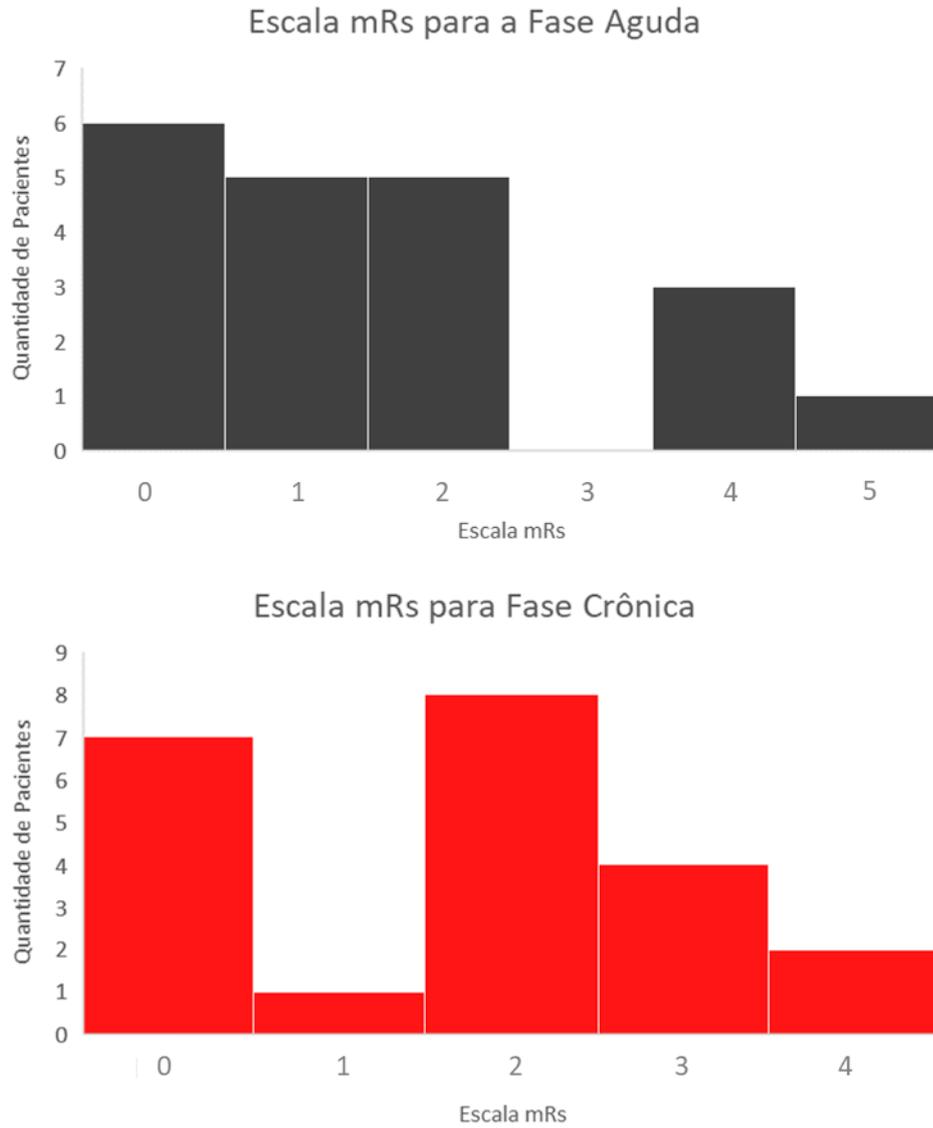


**Figura 11.** Distribuição das escalas de NIHSS entre os pacientes nas fases aguda e crônica do AVC isquêmico. A casuística do grupo de fase aguda está simbolizada em preto e vermelho, representando a evolução dos pacientes, com boa taxa de recuperação dos déficits. A casuística da fase crônica, representada em verde e azul, mostra uma leve recuperação dos déficits, mas com taxa menor do que a dos pacientes da fase aguda.

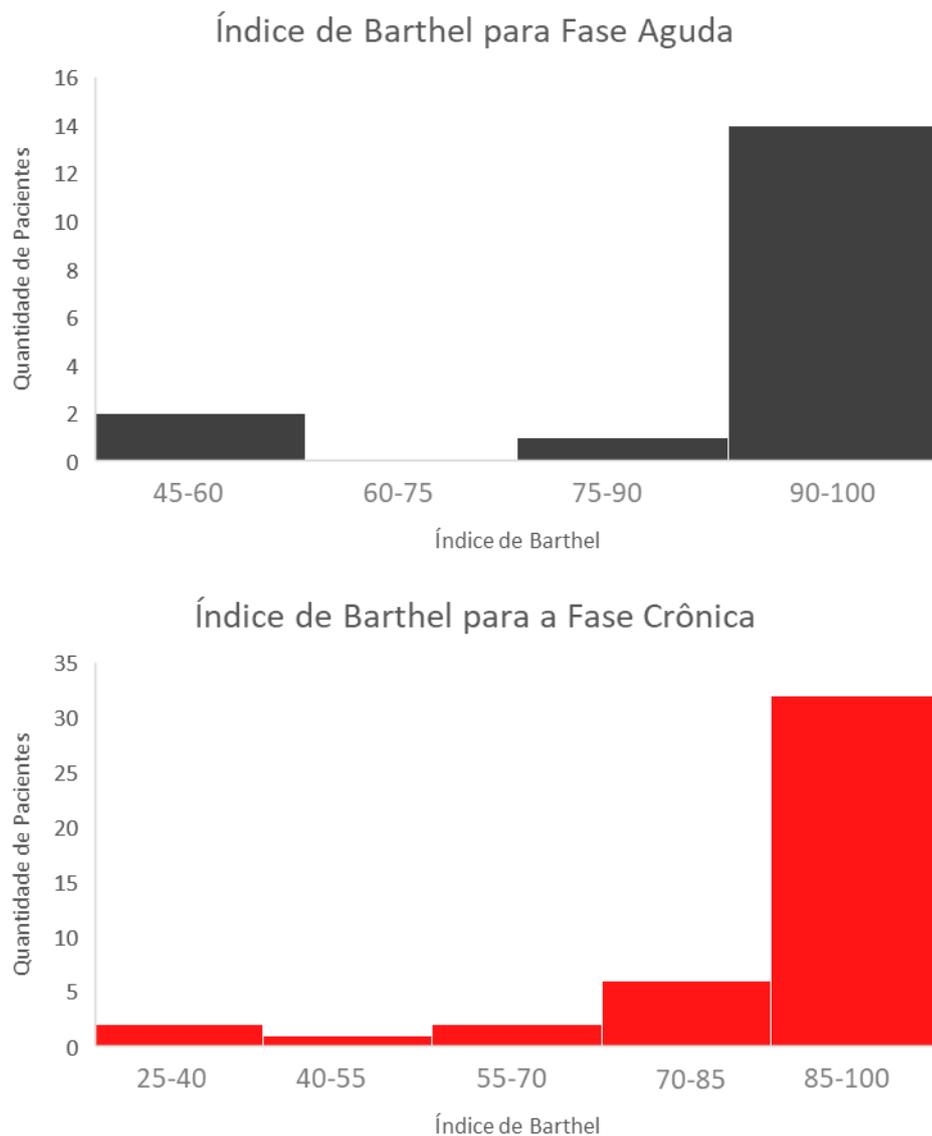
Para o grupo de pacientes na fase crônica, também observamos uma redução na mediana das escalas de NIHSS, porém, os dados possuem alta variabilidade, demonstrando uma heterogeneidade dos prognósticos do AVC para essa casuística. Entretanto, esses estágios (agudo e crônico) desse grupo são estatisticamente diferentes ( $p\text{-valor}=6,05E-05$ ).

Quando comparamos todos os pacientes com AVC isquêmico, notamos uma diferença estatística entre os grupos agudo e crônico ( $p\text{-valor}=1,53E-08$ ).

Para as escalas de mRs e Barthel, a casuística da fase aguda também apresentou melhores taxas de recuperação, exibindo melhores taxas no índice de Barthel (Figura 12; Figura 13).



**Figura 12.** Distribuição da escala mRs para os pacientes da fase aguda (preto) e da fase crônica (vermelho).



**Figura 13.** Distribuição da classificação dos pacientes das fases aguda e crônica, de acordo com o Índice de Barthel. Em preto, apresenta-se a distribuição para a fase aguda, enquanto em vermelho, para a fase crônica.

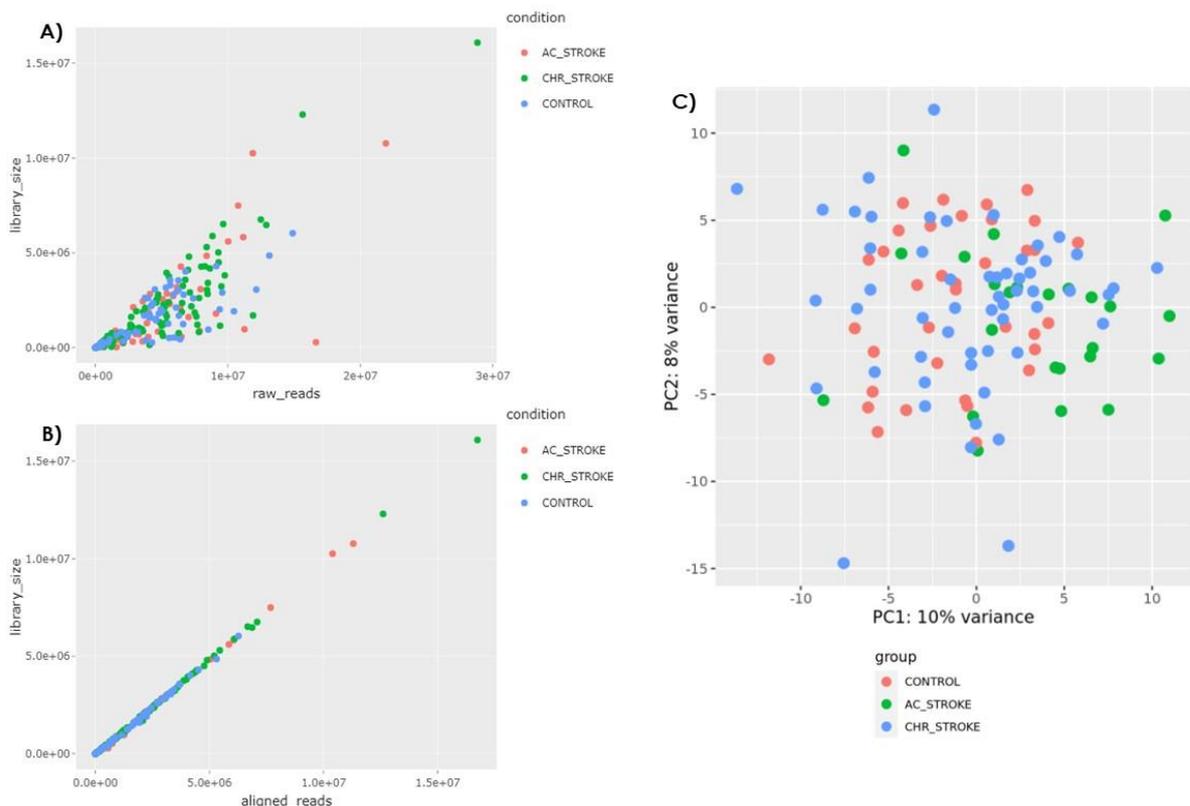
### 3.2. Sequenciamento de *microRNAs*

O sequenciamento dos *microRNAs* gerou em torno de 200 milhões de *reads* por *lane*, ou seja, aproximadamente 5 milhões de *reads* por amostra. Essa profundidade segue as recomendações do fabricante do kit (Qiagen Inc).

A partir dos dados brutos, realizamos uma análise de qualidade dos dados, conforme mostrado na figura 14. Comparando a quantidade de *reads* sequenciados com o tamanho das bibliotecas. Verificamos que os *reads* brutos apresentaram contaminações de fragmentos pequenos em relação às bibliotecas, causando erros

nas chamadas de variáveis significativas (Figura 14A). Por isso, realizamos um filtro de bibliotecas que apresentassem, no mínimo, 1 milhão de *reads*, aumentando a correlação entre as informações analisadas e, conseqüentemente, aumentando a confiabilidade dos resultados encontrados (Figura 14B).

Uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada a fim de avaliar diferenças entre os grupos controle e pacientes, incluindo a variabilidade amostral entre eles (Figura 14C). Essa análise não mostrou diferenças entre as distribuições das amostras, sinalizando semelhanças entre os grupos. Contudo, podemos observar na figura 14C que o grupo de pacientes na fase crônica apresenta uma maior variabilidade amostral, o que pode ser devido às diferenças nos tempos de coleta, à variabilidade do tratamento utilizado para o AVC, às diferentes respostas dos pacientes aos medicamentos ou aos diferentes níveis de recuperação dos mesmos.

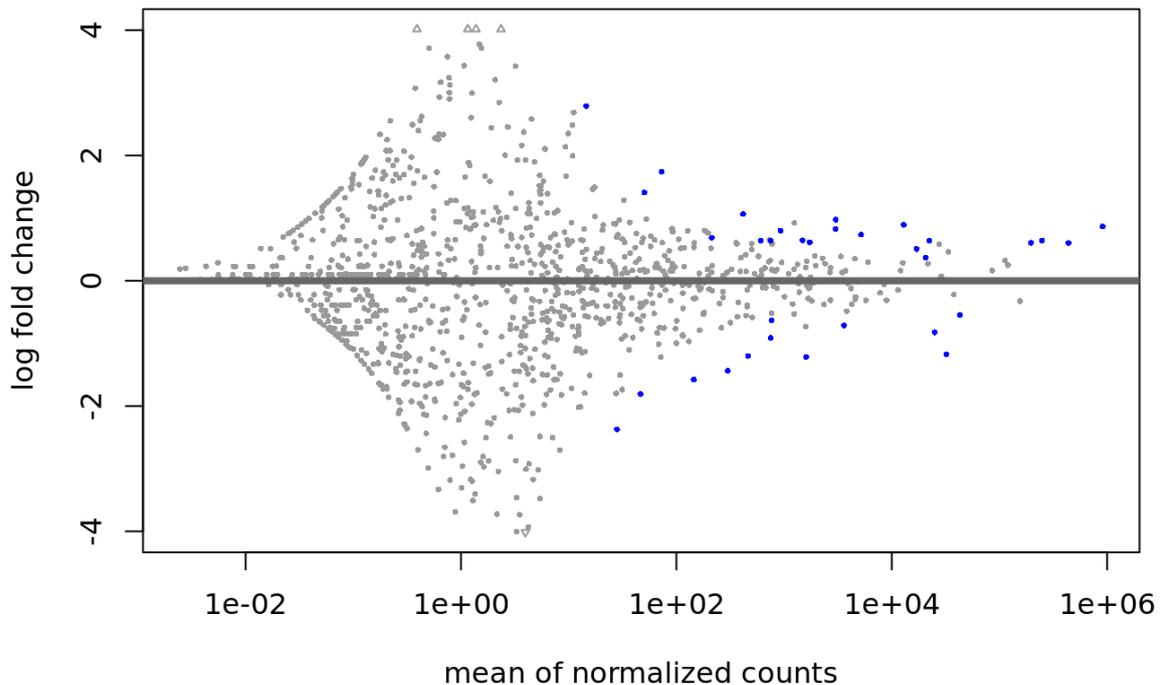


**Figura 14.** Análise de qualidade dos dados sequenciados para microRNAs. A) e B) mostram a relação entre quantidade de *reads* e os tamanhos das bibliotecas. A) A relação dos dados brutos com as bibliotecas mostrou uma contaminação de fragmentos pequenos que poderiam influenciar nos resultados, causando erros de análise. Dessa forma, foi realizado um filtro para seleção de bibliotecas com mais de 1 milhão de *reads*, o que eliminou a contaminação (B). Em C), verificamos a variabilidade das amostras entre os grupos através de um gráfico de PCA. Os grupos apresentam grande similaridade entre as amostras, não sendo possível distinguir entre eles. Contudo, o grupo de pacientes em fase crônica, mostrou uma variabilidade maior entre as amostras do mesmo grupo.

A partir dessa primeira análise, realizamos três comparações entre os dados de microRNAs gerados: AVC em fase aguda vs Controles, AVC em fase crônica vs Controle e AVC em fase aguda vs AVC em fase crônica.

### 3.2.1. AVC em fase aguda vs Controle

A primeira comparação foi realizada entre pacientes com AVC na fase aguda e indivíduos controles a fim de verificar se haveria alguma alteração que pudesse indicar um biomarcador para o início do evento neurovascular. Identificamos, então, 33 microRNAs diferencialmente expressos (Figura 15), dos quais 23 foram exclusivos para essa comparação (Tabela 7).



**Figura 15.** Análise de expressão diferencial de microRNAs comparando grupos de AVC na fase aguda e indivíduos controles. Foram identificados 33 microRNAs diferencialmente expressos, conforme mostrado em azul.

**Tabela 7.** microRNAs diferencialmente expressos e exclusivos para a comparação entre pacientes com AVC na fase aguda e indivíduos controles. (P<sub>adj</sub> = p-valor ajustado por testes estatísticos).

Nome	baseMean	log2FoldChange	pvalor	p <sub>adj</sub>
hsa-miR-142-3p	32142,17	-1,171	3,21e-08	1,07e-05

hsa-let-7g-5p	12883,50	0,893	2,20e-06	3,69e-04
hsa-miR-16-5p	907751,14	0,868	5,61e-06	6,29e-04
hsa-miR-146a-5p	25020,74	-0,822	1,0e-05	8,44e-04
hsa-miR-324-5p	416,31	1,066	1,36e-05	9,20e-04
hsa-let-7c-5p	3009,93	0,826	3,07e-05	1,71e-03
hsa-miR-183-5p	3013,69	0,974	3,93e-05	1,88e-03
hsa-miR-671-5p	299,41	-1,437	1,13e-04	4,75e-03
hsa-miR-486-5p	196381,36	0,605	2,52e-04	9,4e-03
hsa-miR-181b-5p	766,57	-0,63	3,11e-04	1,04e-02
hsa-miR-93-5p	17002,13	0,506	3,60e-04	1,1e-02
hsa-miR-92a-3p	22253,73	0,644	4,20e-04	1,17e-02
hsa-miR-196a-5p	72,72	1,744	5,74e-04	1,45e-02
hsa-miR-15b-5p	924,23	0,800	6,04e-04	1,45e-02
hsa-miR-370-3p	461,54	-1,2	7,25e-04	1,52e-02
hsa-miR-182-5p	5181,95	0,736	6,91e-04	1,52e-02
hsa-miR-134-5p	1606,15	-1,216	8,10e-04	1,60e-02
hsa-miR-17-5p	1730,74	0,612	1,18e-03	2,21e-02
hsa-miR-4732-5p	1481,32	0,645	1,46e-03	2,59e-02
hsa-miR-215-5p	144,878	-1,576	1,59e-03	2,67e-02
hsa-miR-375-3p	751,02	-0,911	1,83e-03	2,93e-02
hsa-miR-493-3p	46,47	-1,808	2,31e-03	3,17e-02
hsa-miR-136-5p	28,03	-2,371	2,45e-03	3,17e-02
hsa-miR-5010-5p	50,402	1,408	2,52e-03	3,17e-02
hsa-miR-21-5p	43025,01	-0,549	2,41e-03	3,17e-02
hsa-let-7b-5p	436897,21	0,603	2,55e-03	3,17e-02
hsa-miR-106b-3p	748,91	0,6402	2,19e-03	3,17e-02
hsa-miR-199b-5p	14,54	2,787	3,49e-03	4,19e-02
hsa-miR-125b-5p	607,72	0,641	4,01e-03	4,64e-02
hsa-miR-25-3p	20520,5	0,369	4,32e-03	4,84e-02
hsa-miR-942-5p	213,02	0,685	4,85e-03	4,96e-02
hsa-miR-1307-3p	3594,1	-0,712	4,87e-03	4,96e-02
hsa-let-7a-5p	249140,20	0,641	4,79e-03	4,96e-02

Dentre os 23 microRNAs identificados exclusivamente para a comparação de agudo vs controle, 16 apresentam-se como hiperexpressos, enquanto 7 foram identificados como hipoexpressos. Podemos destacar, nessa análise, a hiperexpressão dos microRNAs da família do let-7 (let-7c-5p, let-7b-5p e let-7a-5p), miR-324-5p e mir-182-5p, e a hipoexpressão do mir-215-5p. Essas moléculas apresentaram uma ou mais descrições associadas à fisiopatologia do AVC na literatura (121,223–230).

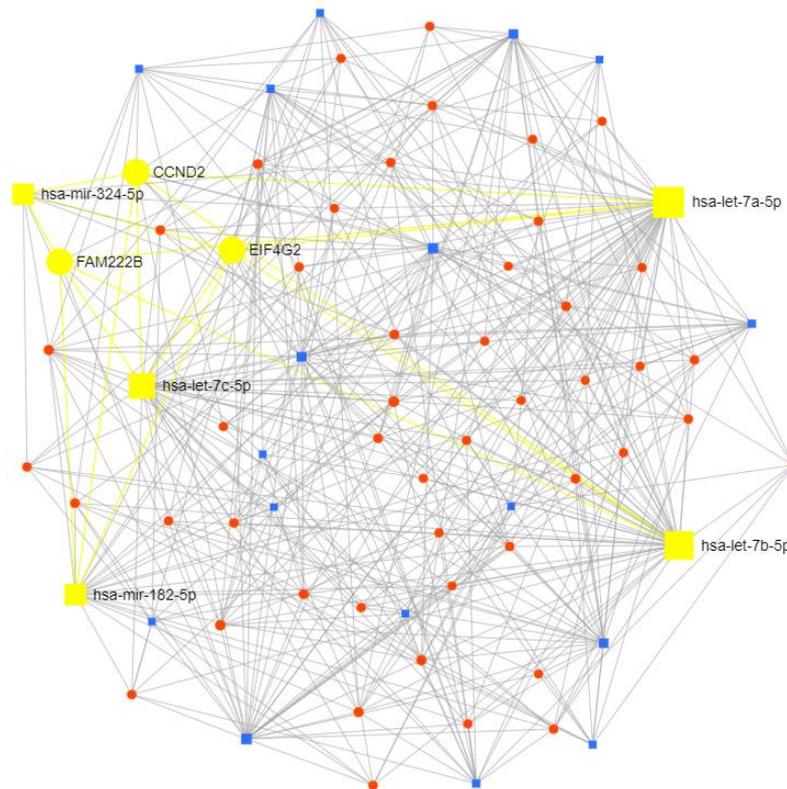
Os microRNAs identificados como diferencialmente expressos nessa comparação foram analisados em rede, visando identificar suas interações gênicas e vias moleculares às quais estão associados. Assim, observamos que os microRNAs let-7a-5p e let-7b-5p são os microRNAs que possuem maior número de interações gênicas e com outros microRNAs (Figura 16).

As principais vias moleculares identificadas nessa análise são: diferenciação de células T, ciclo, divisão, proliferação e diferenciação celular, apoptose, metabolismo de glicose, imunidade inata, hematopoiese, regeneração cardíaca, envelhecimento e miRNAs supressores de tumor (Tabela 8) (222). Com isso, demonstramos que os microRNAs analisados possuem relações com funções basais celulares, realizando a manutenção da viabilidade celular.

Quando avaliamos as interações dos microRNAs hiperexpressos destacados (let-7, mir-182 e mir-324), observamos que eles compartilham genes alvos, como ciclina D2 (*CCND2*), família de sequência similar 222, membro B (*FAM222B*), fator de iniciação translacional eucariótica 4, gama 2 (*EIF4G2*). Esses genes relacionam-se com processos celulares, como proliferação e ciclo celular, tradução proteica, neurogênese e sinalização celular (205,231–235).

**Tabela 8.** Vias moleculares identificadas na comparação de microRNAs entre AVC na fase aguda e controles.

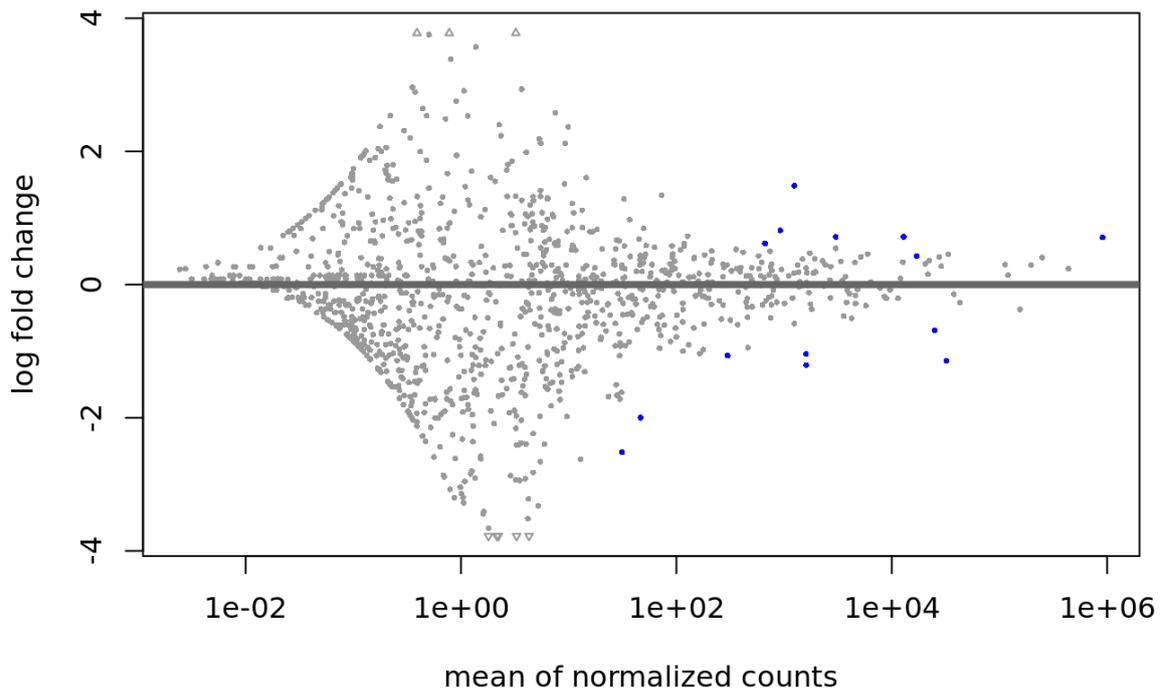
<b>Vias</b>	<b>microRNAs Totais</b>	<b>microRNAs Identificados</b>	<b>Pvalor</b>
Foliculogênese	33	3	0,000151
Diferenciação de Células T	48	3	0,000474
Divisão Celular	50	3	0,000537
Diferenciação Celular	165	4	0,000898
Morte Celular	185	4	0,00142
Metabolismo da Glicose	81	3	0,00228
Proliferação Anti-celular	24	2	0,00359
Imunidade Inata	119	3	0,00707
Hematopoiese	164	3	0,0179
Transição Epitelial-Mesenquimal	172	3	0,0205
Ciclo Celular	178	3	0,0226
Proliferação Celular	181	3	0,0237
Regeneração Cardíaca	63	2	0,024
Envelhecimento	182	3	0,0241
miRNAs Supressores de Tumor	182	3	0,0241
Desenvolvimento Epitelial do Pigmento da Retina	6	1	0,0252
Transição Mesenquimal-Epitelial	12	1	0,0499



**Figura 16** - Análise de rede entre os microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes com AVC na fase aguda e indivíduos controles. Os círculos vermelhos representam os genes, enquanto os microRNAs são representados por quadrados azuis. As linhas cinzas indicam as interações entre as moléculas e os genes alvo, enquanto as amarelas mostram as interações compartilhadas entre os microRNAs de interesse let-7a, let-7b, let-7c, mir-182 e mir-324.

### 3.2.2. AVC em fase aguda vs AVC em fase crônica

A comparação seguinte, foi entre os grupos de pacientes em fase aguda e em fase crônica. O intuito dessa análise foi identificar potenciais biomarcadores para a evolução do AVC, refletindo, inclusive, os principais mecanismos alterados. Foram identificados 14 microRNAs diferencialmente expressos, sendo que apenas 4 foram exclusivos para essa comparação (Figura 17). Os outros 10 foram identificados também na comparação de pacientes com AVC na fase aguda com controles. Esses microRNAs compartilhados entre as análises apresentaram expressão similar em ambas as análises. A tabela 9 relata todos os microRNAs diferencialmente expressos para essa análise.



**Figura 17** - Análise de expressão diferencial de microRNAs comparando grupos de AVC na fase aguda e AVC na fase crônica. Foram identificados 14 microRNAs diferencialmente expressos, conforme mostrado em azul.

**Tabela 9.** microRNAs diferencialmente expressos para a comparação de AVC na fase aguda e AVC na fase crônica. (P<sub>adj</sub> = p-valor ajustado por testes estatísticos)

Nome	baseMean	log2FoldChange	Pvalor	p <sub>adj</sub>
hsa-miR-142-3p	32142,179	-1,149	4,98e-09	1,45e-06
hsa-miR-16-5p	907751,140	0,708	6,56e-05	5,27e-03
hsa-let-7g-5p	12883,503	0,716	4,31e-05	5,27e-03
hsa-miR-146a-5p	25020,744	-0,686	7,25e-05	5,27e-03
hsa-miR-15b-5p	924,232	0,812	1,76e-04	1,026e-02
hsa-miR-206	1245,371	1,484	2,19e-04	1,064e-02
hsa-miR-493-3p	46,472	-1,999	2,89e-04	1,20e-02
hsa-miR-134-5p	1606,152	-1,210	3,31e-04	1,20e-02

hsa-miR-409-3p	1597,110	-1,042	5,70e-04	1,84e-02
hsa-miR-93-5p	17002,130	0,429	1,10e-03	3,05e-02
hsa-miR-183-5p	3013,69	0,715	1,15e-03	3,05e-02
hsa-miR-323b-3p	31,378	-2,518	1,92e-03	4,59e-02
hsa-miR-671-5p	299,417	-1,065	2,05e-03	4,59e-02
hsa-miR-30a-5p	664,333	0,616	2,25e-03	4,69e-02

Os microRNAs exclusivos para essa comparação foram o mir-206, mir-30a, mir-323b e mir-409. Dentre esses, podemos ressaltar os mir-206 e mir-30a, ambos hiperexpressos. Os microRNAs mir-142, let-7g e mir-16, que também aparecem como significativamente expressos na comparação de AVC na fase aguda versus controle, sob mesma relação de expressão, já foram relacionados com os mecanismos de AVC e serão discutidos adiante.

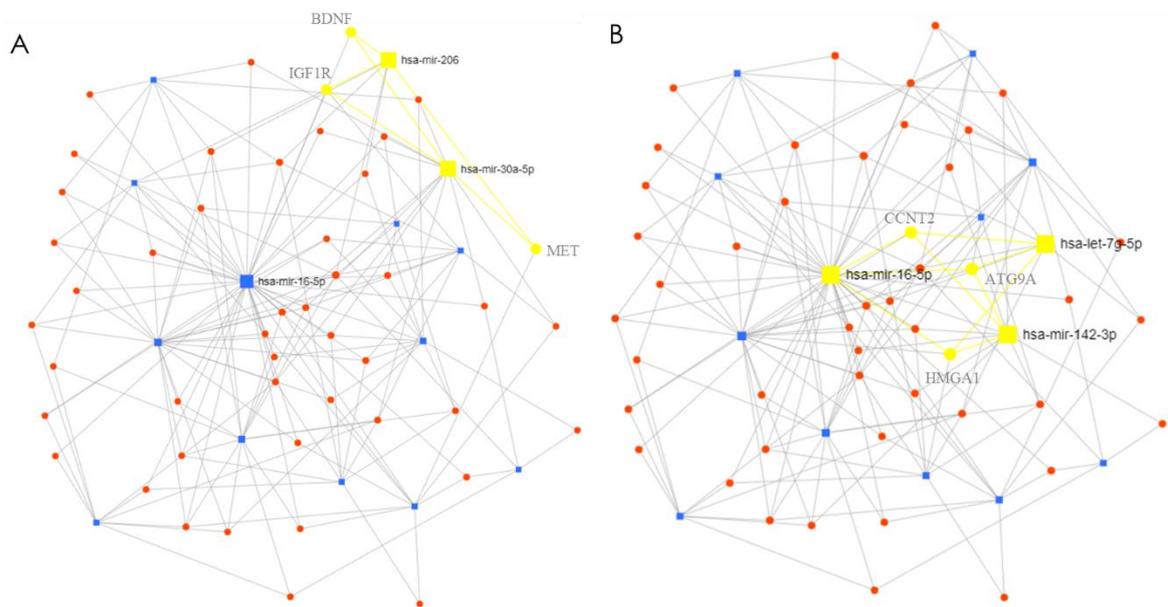
A análise de rede dessa comparação, identificou vias moleculares associadas a: resposta ao dano ao DNA, diferenciação de células T, angiogênese, imunidade inata, proliferação, migração e morte celular (Tabela 10) (222).

Entre os microRNAs de interesse, realizamos duas comparações de interações compartilhadas: a primeira, com os microRNAs de interesse identificados somente para essa comparação (mir-206 e mir-30a); e outra com os compartilhados com a comparação agudo versus controle (let-7, mir-16 e mir-402) (Figura 18). Isso foi necessário por não identificarmos interações semelhantes entre todos os microRNAs de interesse.

**Tabela 10.** Vias moleculares associadas com os microRNAs identificados na comparação de AVC na fase aguda e AVC na fase crônica

Vias	microRNAs Totais	microRNAs Identificados	Pvalor
Resposta ao Dano ao DNA	48	3	0,0152
Diferenciação das Células T	48	3	0,0152

Diferenciação de Células do Músculo	63	3	0,0316
Esquelético			
Angiogênese	171	5	0,0331
Hemeostase da Cavidade Peritoneal	68	3	0,0386
Imunidade Inata	119	4	0,0388
Proliferação Celular	181	5	0,0415
Morte Celular	185	5	0,0452
Migração Celular	31	2	0,0476



**Figura 18** - Análise de rede entre os microRNAs de interesse para AVC na fase aguda vs AVC na fase crônica e os respectivos genes alvo. **A)** Interação entre os microRNAs diferencialmente expressos identificados exclusivamente para essa comparação (mir-206 e mir-30a). Os microRNAs compartilham regulação com os genes *BDNF*, *IGF1R* e *MET*. **B)** Interação entre os microRNAs diferencialmente expressos identificados tanto para AVC na fase aguda com AVC na fase crônica quanto para controles (let-7g, mir-142 e mir-16). Os microRNAs compartilham regulação com os genes *CCNT2*, *ATG9A* e *HMGA1*.

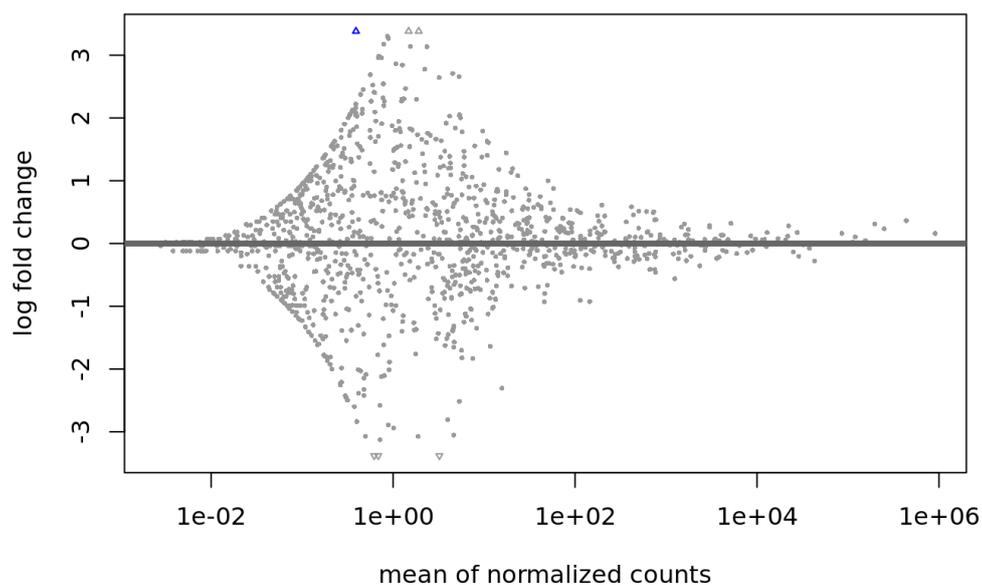
A primeira comparação de rede, mostrou que os microRNAs compartilham os genes alvo: fator neurotrófico cerebral (*BDNF*), receptor 1 do fator de crescimento como insulina (*IGF1R*) e receptor de tirosina quinase (*MET*). A segunda, por sua vez, compartilha os seguintes genes alvo: ciclina T2 (*CCNT2*), relação à autofagia 9A (*ATG9A*) e grupo de alta mobilidade AT 1 (*HMGA1*). Esses genes tem funções vinculadas à diferenciação, proliferação e sobrevivência neuronal, plasticidade

sináptica, neuroproteção, angiogênese e sinalização celular em diversas doenças, inclusive AVC (88,236–250).

### 3.2.3. AVC em fase crônica vs Controle

A última comparação foi entre os grupos de AVC na fase crônica e indivíduos controles. Essa análise foi realizada visando a identificação de microRNAs que pudessem estar associados com o prognóstico dos pacientes.

Pudemos observar que apenas 1 microRNA foi considerado diferencialmente significativo na análise: mir-34c (Tabela 11, Figura 19). Esse microRNA possui 154 genes alvos e foi relacionado com vias moleculares de permeabilidade da barreira hematoencefálica, resposta ao dano ao DNA, regeneração óssea, diferenciação, proliferação e ciclo celular (Tabela 12, Figura 20) (222).



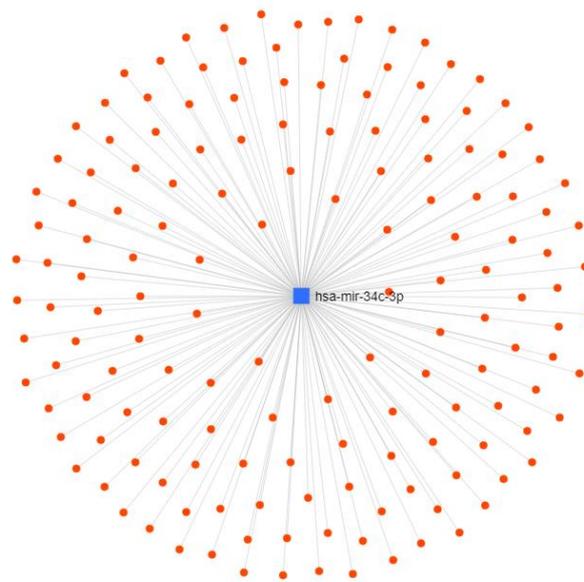
**Figura 19** - Análise de expressão diferencial de microRNAs comparando grupos de AVC na fase crônica e controles. Foi identificado apenas 1 microRNA diferencialmente expresso, conforme mostrado em azul.

**Tabela 11** - microRNA diferencialmente expresso na comparação de pacientes com AVC na fase crônica e indivíduos controles. (Padj = p-valor ajustado por testes estatísticos)

Nome	baseMean	log2FoldChange	pvalor	padj
hsa-miR-34c-3p	0,390	14,908	8,32e-06	0,0102

**Tabela 12.** Vias moleculares associadas com o microRNA mir-34c identificado para a fase crônica do AVC.

Vias	microRNAs Totais	microRNAs Identificados	Pvalor
Diferenciação de Podócitos	6	1	0.00634
Formação da Rede de Filamentos de Actina	9	1	0.00951
Permeabilidade da Barreira Hematoencefálica	9	1	0.00951
Desenvolvimento do Estágio de Clivagem	10	1	0.0106
Ativação de células estreladas hepáticas	12	1	0.0127
Resposta ao Dano ao DNA	48	1	0.0507
Cardiotoxicidade	50	1	0.0529
Reparo ao Dano ao DNA	53	1	0.056
Diferenciação de Osteoblastos	70	1	0.074
Regeneração Óssea	87	1	0.092
Osteogênese	164	1	0.173
Diferenciação Celular	165	1	0.174
Ciclo Celular	178	1	0.188
Proliferação Celular	181	1	0.191
miRNAs Supressores de Tumor	182	1	0.192



**Figura 20** - Análise de rede mostrando as 154 interações gênicas do microRNA mir-34c.

#### 4. Discussão

A complexidade do AVC é refletida na diversidade de processos moleculares de desenvolvimento e recuperação da doença. Enquanto a fase aguda é caracterizada por processos inflamatórios, danos teciduais e morte celular, a fase crônica tem foco na recuperação e delimitação dos déficits causados pela isquemia, reestabelecendo o equilíbrio homeostático.

Considerando essas diferenças, a busca por biomarcadores deve ser específica para cada uma dessas fases, auxiliando a identificação de novos mecanismos e moléculas para diagnóstico, prognóstico e tratamento do AVC.

Nas nossas análises, identificamos alguns microRNAs diferencialmente expressos na fase aguda do AVC. Em um primeiro momento, em uma comparação entre pacientes e indivíduos controles, buscamos moléculas que pudessem estar associadas ao início do evento isquêmico, favorecendo mecanismos de ação da doença, moléculas diagnósticas e classificação etiológica do evento.

Observamos uma hiperexpressão da família de microRNAs let-7 (let-7a, let-7b, let-7c e let-7g) nas nossas amostras, corroborando com os achados descritos na literatura. Esses microRNAs são altamente descritos como associados, direta ou

indiretamente, a processos que envolvam o desenvolvimento e tratamento do AVC, como homeostase nutritiva, resistência à insulina, inflamação, manutenção de células vasculares e neuroproteção após danos isquêmicos (224–226,251–253), em especial na fase aguda. Para esse estágio, o microRNA let-7e foi descrito como potencial biomarcador para o primeiro momento após o ictus do AVC (223).

O efeito neuroprotetor desses microRNAs está relacionado com a regulação da inflamação pós AVC (226,252). O microRNA let-7a foi descrito como regulador do processo inflamatório pela repressão da expressão de genes associados com os mecanismos de sinalização molecular (226,254). Cho et al (2015) identificaram que a hiperexpressão do let-7a prioriza a formação do fenótipo M2 (neuroprotetor) da micróglia, gerando uma redução do estresse oxidativo e morte celular causada pelo evento isquêmico (226).

Os níveis de let-7c foram descritos por Ni et al (2015) como reduzidos, tanto em humanos quanto em modelo animal, logo após evento isquêmico (252). Essa redução da expressão do let-7c pode estar relacionada com a gravidade dos eventos nos pacientes e animais estudados. Todavia, a hiperexpressão dessa molécula também foi relacionada com a regulação da neuroinflamação devido à redução da expressão da caspase 3 na micróglia (252). Além disso, ele ainda influencia a polarização de macrófagos, reduzindo inflamação e citotoxicidade local (255). Devido à hiperexpressão dessa molécula reduzir o tamanho da área isquêmica e melhorar as funções motoras e cerebrais dos pacientes, o let-7c é um candidato promissor ao tratamento do AVC isquêmico.

Em hepatocarcinomas, outro microRNA da família do let-7 foi identificado como associado à regulação de processos inflamatórios: let-7b (251). Sob essa condição, as células cancerígenas liberam vesículas celulares contendo o microRNAs let-7b, que reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6), nos macrófagos (251).

O let-7g, por sua vez, foi descrito como um importante promotor do processo de autofagia e apoptose em células do músculo liso vascular, através da hiporegulação do receptor IGF1R, membro da via mTOR (256). Baixos níveis do let-7g foram associados como fator de risco para AVC lacunar e com o aumento dos níveis de LDL circulantes (257). Quando hiperexpresso, o let-7g pode inibir a

proliferação e migração celular e atenuar os processos de aterosclerose (258). Rom et al (2015) demonstraram *in vivo* e *in vitro* que a hiperexpressão do let-7g pode ter efeito protetor contra processos neuroinflamatórios (259). De fato, Bernstein et al (2020) observou que a presença do let-7g foi associada com a redução dos danos neuronais após 72h de evento isquêmico (225). Isso ocorre devido à interferência no miRNA na adesão dos leucócitos à barreira hematoencefálica, o que pode gerar danos isquêmicos e encefalites (259).

A presença desse miRNA também foi associada a atenuação da aterosclerose devido à redução da expressão dos genes *LOX1* e dos presentes na cascata do TGF- $\beta$  (*THBS1*, *TGFBR1*, *PAI-1* e *SMAD2*), com consequente indução da angiogênese, redução da adesão de monócitos e inflamação em estudos *in vivo* (257,258).

O let-7g foi significativamente expresso tanto na comparação dos pacientes com AVC na fase aguda e controles quanto na comparação com os pacientes com AVC na fase crônica. Essa hiperexpressão na fase aguda nos leva a crer que o let-7g está altamente associado com mecanismos do AVC, tendo uma expressão significativa no início do evento, abrandada ao longo dos meses seguintes.

Dessa forma, é possível compreender que a família let-7 tem relevante presença nos processos neurológicos e, especialmente, nos neurovasculares. A identificação destes miRNAs levemente hiperexpressos na fase aguda dos pacientes com AVC pode simbolizar uma tentativa de regulação da neuroinflamação gerada pela doença e controle da apoptose, causada pelo processo de hipóxia tecidual. Esses achados corroboram com os identificados na literatura e com a melhora no prognóstico desses pacientes nos meses seguintes, mostrada pela evolução da escala NIHSS (Figura 4).

O miRNA mir-182 é amplamente estudado no campo da oncologia, porém sua influência biológica ainda é controversa. Alguns estudos demonstram que o mir-182 possui efeito benéfico nos pacientes oncológicos, melhorando seus prognósticos, enquanto outros o colocam como alvo do aumento de fatores inflamatórios e metástases (228,260–262). Essas informações podem indicar que o miRNA mir-182 tem uma atividade dependente das condições do ambiente fisiológico celular, com função dependente de contexto (263). Lee et al (2018) tenta explicar a diferença entre as teorias do mir-182 ter funções pro ou anti-tumorigênicas (264). De acordo com ele,

o mir-182 funciona como um ativador ou desativador do processo EMT em tecidos hipóxicos, podendo, assim, ter diferentes efeitos biológicos em diferentes condições fisiológicas (264).

Hipóxia parece ser um dos principais fatores de ativação do mir-182. O aumento do mir-182 tende a causar o aumento do processo de glicólise e angiogênese em tecidos sob hipóxia, gerando um aumento da proliferação cancerosa (260,265). Ele também já foi descrito como ativador do acúmulo de lipídios em lesões ateroscleróticas, o que aumenta a secreção de fatores pró-inflamatórios e a aterogênese, por consequência (261).

Entretanto, mir-182 foi descrito por Wang et al (2017) como um dos principais reguladores da inflamação e apoptose neuronal em pacientes com AVC (228). O aumento desse miRNA gera uma redução dos processos apoptóticos através da regulação do gene *TLR4* (228). Isso gera um efeito protetor, com redução do volume do infarto cerebral, com aumento das funções neurológicas (228).

Nos nossos dados, esse miRNA aparece levemente aumentado nos pacientes com AVC em fase aguda. Apesar das descrições controversas, podemos concluir que a presença desse microRNA tem efeito benéfico nos pacientes com a tentativa de reduzir os danos teciduais pelo aumento da angiogênese e redução da inflamação e apoptose.

O mir-324 também já foi descrito como alterado em condições de hipóxia em estudos oncológicos *in vitro* (230). Contudo, o resultado é controverso, já que diferentes técnicas o identificaram como hipo- e hiperexpresso sob as mesmas condições (230). Apesar disso, podemos observar que ele apresenta alterações na sua expressão em condições de baixa oxigenação celular. Além disso, o mir-324 foi identificado como importante regulador do crescimento e invasão celular em células cancerosas (266). Para o AVC, o mir-324 também foi observado como hiper expresso em pacientes com AVC hemorrágico subaracnóide, sendo considerado um potencial biomarcador para essa condição (267). Contudo, seu efeito ainda não foi completamente elucidado para a doença e nem identificado como alterado na fase aguda do AVC isquêmico (267).

Em processos isquêmicos, a alta expressão do mir-324-3p tem efeito benéfico e cardioprotetor em modelo de isquemia e reperfusão cardíaca (268). Indiretamente,

sua hiper expressão pode ser proporcionalmente correlacionada com a expressão do gene *FoxO1*, responsável pela redução do estresse cardíaco após reperfusão, através da expressão de genes antioxidantes e antiapoptóticos (268). Entretanto, as interações diretas do mir-324 nas condições isquêmicas ainda não foram completamente esclarecidas (268).

O microRNA mir-215, por sua vez, foi observado como hipoexpressos na fase aguda do evento isquêmico. Quando hiperexpresso, esse microRNA está relacionado com funções neuroprotetoras, com inibição de processos apoptóticos, redução do tamanho da área isquêmica e melhora das funções cerebrais (227). Contudo, sua hipoexpressão na nossa análise é controversa, indicando que sua expressão possa ser dependente de fatores clínicos ou esteja relacionado com mecanismos do início do evento, onde ocorre maior dano cerebral.

Para a fase aguda do AVC, também observados microRNAs associados à exossomos, como o mir-25 e o mir-134 (122,269). O mir-25 foi observado exclusivamente em modelo animal para AVC isquêmico, de modo que age na ativação da proliferação de células tronco neuronais e na redução da morte neuronal pela regulação de proteínas apoptóticas (269,270). A hiperexpressão do mir-134, por sua vez, foi associada ao aumento da morte neuronal e danos teciduais pós condições isquêmicas, de modo a ser um potencial marcador de prognóstico e alvo terapêutico (122,271–273). A hipoexpressão dessa molécula na nossa casuística pode ser um indicativo de bom prognóstico da doença nesses pacientes.

Observamos também, alguns microRNAs não descritos na literatura para AVC, porém, com expressão significativa na fase aguda do AVC isquêmico na nossa casuística. Dentre eles, citamos a hipoexpressão dos microRNAs mir-671, mir-370 e mir-1307; e a hiperexpressão dos microRNAs mir-4732, mir-5010 e mir-942. Todos esses microRNAs foram descritos na literatura atuando no controle da proliferação celular em diversos tipos de câncer e na doença de Parkinson (274–283).

O grupo de pacientes na fase aguda também foi comparado com o AVC na fase crônica, a fim de identificar moléculas que pudessem estar associadas à evolução da doença e predição de prognóstico.

Aqui, descrevemos os microRNAs associados com a fase aguda em duas comparações: os que foram identificados em todas as análises (tanto na comparação

com a fase crônica quanto com controles) e os que estão associados exclusivamente com a comparação entre as fases aguda e crônica. Isso nos auxiliou a tentar separar os microRNAs relacionados à fase aguda do evento, dos microRNAs que pudessem estar agindo sobre a evolução da doença.

No primeiro subgrupo, então, temos os microRNAs que foram identificados em ambas as comparações da fase aguda: mir-16, mir-142 e let-7g.

O microRNA mir-142 foi descrito com funções de regulação de apoptose e inflamação sob diferentes condições (284–286). Um estudo *in vitro* mostrou que a presença do mir-142 coordenava a expressão preferencial da polarização de macrófagos M2, controlando processos inflamatórios (285). Por sua vez, a hipoexpressão desse microRNA está associada com a redução da apoptose, principalmente em placas ateroscleróticas (284,286). Níveis reduzidos desse microRNA também foram descritos Wang et al (2017) como protetor para eventos isquêmicos, reduzindo os danos celulares e estresse oxidativo causados pela hipóxia (287). Dessa forma, o mir-142 tende a reduzir os efeitos causados pela isquemia, apresentando resultados benéficos aos pacientes.

O microRNA mir-16, semelhantemente ao mir-142, apresenta um risco reduzido para a ocorrência do AVC. Ele foi identificado como potencial biomarcador para a fase hiperaguda de AVC de grandes artérias (288). Além do mais, Rainer et al (2016) observaram que o mir-16 é um bom marcador de prognóstico, já que altos níveis dessa molécula foram identificados em pacientes com escala modificada de Rankin menor ou igual a 2 (289). A maioria dos pacientes da nossa casuística apresenta essa condição, corroborando, então, com os descritos na literatura.

Para os microRNAs que foram observados apenas na comparação de fase aguda com fase crônica, dois se sobrepuseram com expressão elevada: mir-206 e mir-30a.

A função do microRNA mir-206 está associado com processos celulares, como proliferação, diferenciação e morte celular (290,291). Apesar de apresentar funções importantes durante o processo de diferenciação celular, o mir-206 foi observado como não essencial para os mecanismos de miogênese, agindo como modulador da diferenciação de mioblastos (290). Esse microRNA também foi relacionado com processos de proliferação e morte celular em estudos *in vitro* (291). A hiperexpressão

do mir-206 promove a inibição da expressão do gene *Otx2*, com consequente redução da proliferação celular e promoção da apoptose de células neuronais (291).

Para AVC, o mir-206 age como um indicador da gravidade do evento isquêmico, contribuindo para o aumento do tamanho do infarto do tecido cerebral após isquemia (292). He e colaboradores (2019) observaram um aumento na expressão desse microRNA em pacientes com AVC isquêmico moderado ou severo (292). Assim, o aumento do mir-206 na nossa casuística indica eventos mais graves, com piora do prognóstico e redução da proliferação celular.

O mir-30a é altamente descrito para AVC, seja como biomarcadores da fase aguda e hiperaguda, ou como marcadores de danos isquêmicos (121,123,293,294). O aumento nos níveis de mir-30a foi identificado nas fases hiperaguda, mas não na aguda, do AVC isquêmico, sendo descrito como um potencial biomarcador para distinguir entre os diferentes estágios do evento (121). Fu et al (2018) identificaram que a hiperexpressão do mir-30 reduziu a resposta inflamatória e estresse oxidativo pela regulação da via MAPK/ERK (295). A inibição do mir-30a também foi observada como associada à redução da permeabilidade da barreira hematoencefálica e acúmulo de zinco no tecido cerebral (294). Tratamentos com inibidores desse microRNA pode reduzir o tamanho do infarto e melhorar os déficits neurológicos pós isquemia (294).

Mir-30a age regulando o processo de autofagia celular pela redução de *Beclin-1*, uma molécula chave na indução desse processo, regulando a morte neuronal em condições isquêmicas (293,296). Altos níveis de mir-30a, induzem a hipoexpressão dos RNAs MALAT1 (transcrito 1 associado à metástase do adenocarcinoma pulmonar) e *Beclin-1*, atenuando a perda neuronal e consequente melhora do prognóstico isquêmico (293).

Esses achados induzem que níveis aumentados desse microRNA no AVC isquêmico podem significar uma tentativa de redução do processo inflamatório tecidual, com aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, redução dos danos isquêmicos e proteção neuronal.

Por fim, para os pacientes na fase crônica do AVC, observamos apenas um microRNA diferencialmente expresso nas nossas análises: mir-34c. Níveis aumentados nesse microRNA foram descritos como redutores do risco para eventos

isquêmicos e dos níveis de óxido nítrico neuronal (nNOS) (297,298). Esses efeitos causam uma proteção contra novos eventos e permitem uma melhor recuperação tecidual após a isquemia. Dessa forma, o mir-34c tende a apresentar funções benéficas para a recuperação dos déficits causados pelo AVC.

As análises de rede para os microRNAs realizadas nessa análise identificaram vias moleculares coerentes com os mecanismos e estágios da doença. Para a fase aguda, foram detectadas vias associadas a processos celulares basais (como proliferação e diferenciação celular), apoptose, metabolismo energético e sistema imune. Esses mecanismos estão altamente ativados nesse estágio do AVC. Já na fase crônica, foi possível observar, além das vias celulares basais, a via de permeabilidade da barreira hematoencefálica. Esse mecanismo é essencial para manter a integridade cerebral e regenerar os danos causados no tecido após o período isquêmico. Dessa forma, as vias moleculares apresentaram uma coerência entre o fenótipo e o observado na análise.

Os microRNAs destacados nessa análise também apresentaram similaridade quanto aos seus genes alvo. Na fase aguda, os microRNAs hiperexpressos possuem interações com genes relacionados à proliferação e ciclo celular, neurogênese e sinalização celular (205,231,233,235). Para a comparação entre fase aguda e crônica, os microRNAs interagem com genes associados à diferenciação, proliferação e sobrevivência neuronal, plasticidade sináptica, neuroproteção, angiogênese e sinalização celular em diversas doenças, inclusive AVC (236–238,241,242,247). Entretanto, algumas relações entre microRNAs e genes podem ser contraditórias com a fisiologia do AVC observada nesse estudo (231,235,243,244,299). Infelizmente, para a comprovação dessa interação e funcionalidade, estudos mais aprofundados são necessários.

Os pacientes estudados para a fase aguda do AVC apresentaram uma alta variabilidade e gravidade dos eventos isquêmicos, seguida de considerável melhora nos déficits, de acordo com as escalas utilizadas. Esses dados corroboram com os achados de microRNAs, que simbolizam efeitos benéficos à fisiologia do AVC na fase aguda. A hipossíntese do microRNA mir-215 pode ser um símbolo da alta variabilidade na gravidade do evento nos pacientes da fase aguda.

Em contrapartida, os pacientes na fase crônica apresentaram uma alta variabilidade prognóstica, o que pode ser a causa da presença de microRNAs com funções prejudiciais às funções neurológicas, aumentando os déficits após o AVC, como é o caso do microRNA mir-206.

Dessa forma, para solucionar esse fato, estudos funcionais e validações dos microRNAs encontrados, além de uma descrição precisa da clínica dos pacientes, se faz necessária para resultados mais precisos.

## **5. Considerações Finais**

Nessa análise, buscamos identificar biomarcadores para as fases aguda e crônica do AVC isquêmico.

- Para a fase aguda, identificamos os microRNAs let-7, mir-182, mir-324 e mir-215 como significativamente alterados nos pacientes, em comparação com os controles. Comparando com pacientes na fase crônica, os microRNAs mir-142, mir-16, mir-206 e mir-30a foram destacados como estatisticamente alterados na fase aguda do AVC nesses pacientes.
- Para a fase crônica, identificamos uma hiperexpressão estatisticamente significativa do microRNA mir-34c quando comparado com indivíduos controles.
- Identificamos que, para a fase aguda, os microRNAs tendem a apresentar um efeito benéfico na fisiologia do AVC, regulando processos inflamatórios, angiogênicos e de danos ao tecido cerebral sob hipóxia. Com base nos dados clínicos da nossa casuística, percebemos que realmente há uma redução dos déficits causados pelo AVC na evolução da doença nos pacientes de fase aguda. Em contrapartida, os microRNAs identificados na fase crônica apresentam correlação com processos de regeneração tecidual após isquemia, o que corrobora com as descrições na literatura e fisiologia da doença. Os dados clínicos da casuística mostram que há uma maior heterogeneidade na recuperação dos pacientes na fase crônica, o que pode explicar a identificação de microRNAs com expressão controversa entre nossos dados e o descrito na literatura. De toda forma, foi observado uma boa correlação entre a expressão dos microRNAs identificados e a fisiologia do AVC.

## **Seção 2 – microRNAs Presentes em Vesículas Extracelulares**

### **1. Objetivos da Seção**

#### *Geral*

Identificar microRNAs presentes em vesículas extracelulares obtidas de plasma de pacientes com AVC isquêmico.

#### *Específicos*

- i. Determinar o padrão de expressão de microRNAs presentes dentro de vesículas extracelulares circulantes em plasma de pacientes com AVC isquêmico em fase crônica.
- ii. Comparar o padrão de expressão de microRNAs circulantes obtido diretamente de amostras de plasma com aquele obtido de amostra de vesículas extracelulares presente no plasma.

### **2. Métodos**

#### *2.1. Casuística*

Para essa análise foram utilizadas 10 amostras de plasma de pacientes com AVC isquêmico em fase crônica e 10 amostras de indivíduos controles, sem AVC. Os métodos de seleção, processamento e armazenamento das amostras seguiu o descrito na *Seção 1, item 2.1. Casuística*. As amostras de pacientes selecionadas para essa casuística foram divididas aleatoriamente entre os subtipos de AVC cardioembólico e aterosclerose de grandes artérias.

As amostras foram enviadas, em gelo seco, para o Centro Interdisciplinar de Nanociências (iNANO), na Universidade de Aarhus (Aarhus, Dinamarca), onde as extrações e análises foram realizadas. As amostras chegaram congeladas, sem riscos de perda da qualidade amostral. O plasma foi armazenado novamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

## 2.2. Purificação das Vesículas Extracelulares e Sequenciamento dos *microRNAs*

O plasma foi processado utilizando o kit Mircure Exosome Serum/Plasma (Qiagen, Inc) para a obtenção das vesículas extracelulares, em especial, exosomos. Esse kit utiliza o método de purificação baseado na purificação por polietilenoglicol (PEG) (300,301).

Após a purificação das vesículas, as amostras foram processadas utilizando o kit miRNeasy Serum/Plasma Advanced (Qiagen, Inc) para a extração de moléculas de RNAs presentes nas vesículas.

A realização das bibliotecas de sequenciamento a partir dos RNAs se deu pelo kit Qiaseq miRNA Library (Qiagen, Inc), sob as recomendações do fabricante. Todas as bibliotecas, de pacientes e controles, foram unidas em um único *pool* de sequenciamento, separadas com índices exclusivos para cada amostra.

As bibliotecas tiveram suas qualidades verificadas através de quantificação por Qubit (Thermo Fischer, Inc) e PCR quantitativo, utilizando o kit Kapa Library Quantification (Roche Sequencing, Inc). A integridade das bibliotecas, incluindo o tamanho dos fragmentos foi analisada por bioanalyzer, com o chip DNA High Sensitivity (Agilent Technologies, Inc). As bibliotecas foram sequenciadas em equipamento NextSeq 500 (Illumina, Inc), com 75 ciclos *single end*.

As análises do sequenciamento ocorreram utilizando o software DeSeq2 (220).

Foi realizada uma análise de interações em rede, com identificação das principais vias moleculares afetadas pelos *microRNAs* diferencialmente expressos. Essa análise foi realizada pelo software mirnet 2.0 (<https://www.mirnet.ca/>) (222).

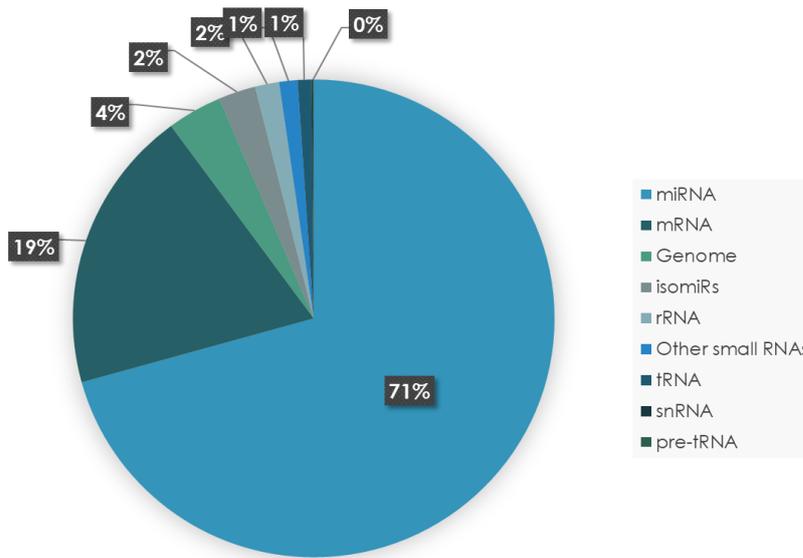
Foi realizada uma comparação entre os *microRNAs* identificados nas análises de EVs e plasma total, visando observar semelhanças e diferenças entre os padrões de expressão dessas moléculas. Para que essa análise seja equiparável, a comparação foi feita com os dados de AVC na fase crônica e controles, utilizando apenas os valores de *p*, sem correção estatística.

Por fim, utilizando uma regressão binomial Lasso, no software R, foi elaborada uma predição fenotípica com os *microRNAs* com expressão significativa menor que 0,01. Para isso, as amostras foram separadas, aleatoriamente, em dois grupos: treino

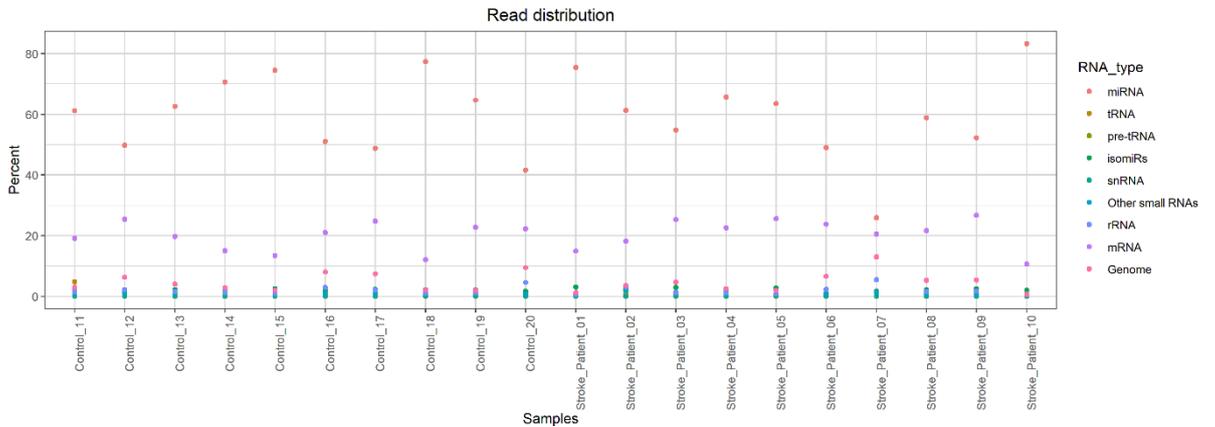


### 3.2. Sequenciamento dos microRNAs

Realizamos uma análise de qualidade dos dados, visando identificar qual a composição molecular dessas vesículas analisadas. Assim, observamos que 71% dos nossos dados pertenciam a microRNAs, seguido por fragmentos RNAs mensageiros e pequenos fragmentos genômicos (Figura 22). De forma geral, os microRNAs formam, pelo menos, 40% do conteúdo molecular de uma EV (Figura 23).



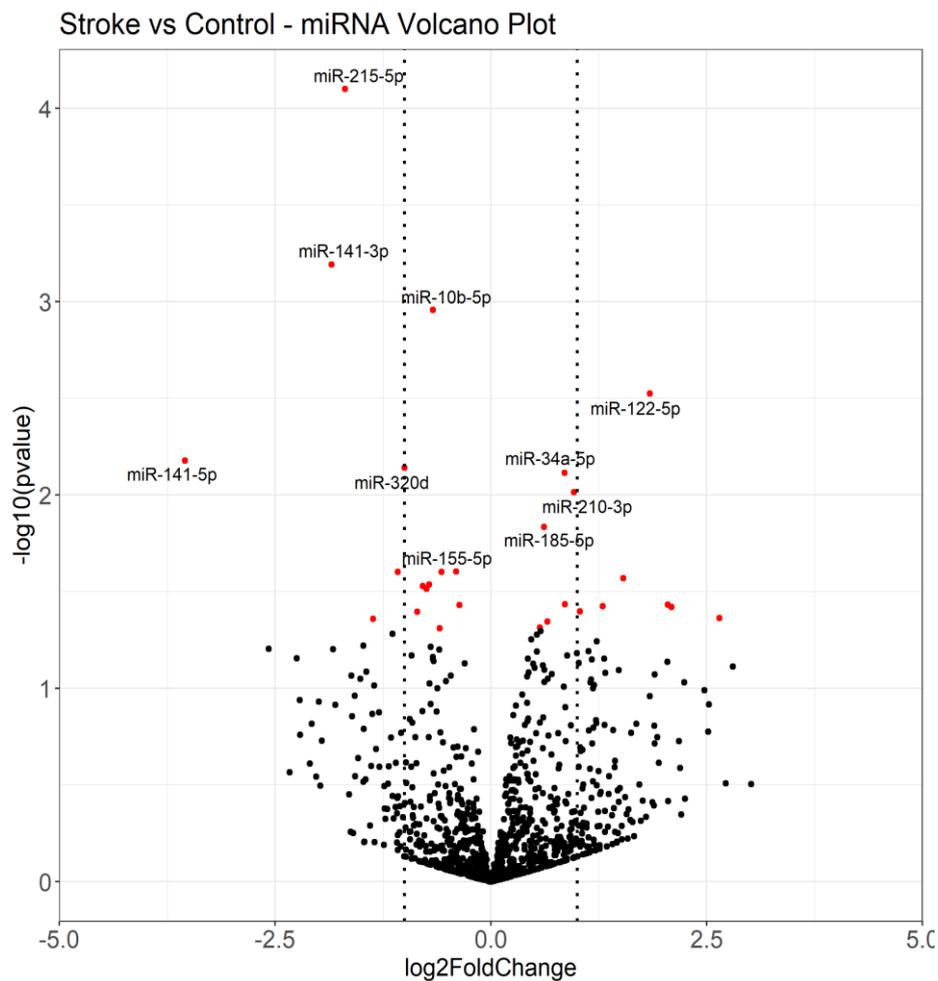
**Figura 22.** Composição molecular da EVs purificadas de amostras de AVC isquêmico, após sequenciamento de pequenos RNAs.



**Figura 23.** Distribuição das moléculas sequenciadas presentes em EVs, por amostra.

Após a análise de expressão diferencial, obtivemos 28 microRNAs significativos, sem ajuste de múltiplos testes e com valor de p menor ou igual a 0,05 (Figura 24; Tabela 13).

Podemos observar que o microRNA mir-215 também foi identificado nessa análise, com níveis hipoexpressos. Esse microRNA foi a molécula com maior significância na amostra (menor valor de p). Os microRNAs mir-122 e mir-185 foram os que tiveram maior frequência nos dados amostrais.



**Figura 24.** 28 microRNAs diferencialmente expressos para a comparação entre AVC e controles para amostras de vesículas extracelulares.

**Tabela 13.** microRNAs diferencialmente expressos ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ) na comparação entre pacientes e controles, para moléculas presentes em EVs. ( $P_{\text{adj}}$  = p-valor ajustado por testes estatísticos)

miRNAs	baseMean	log2FoldChange	Pvalor	padj
--------	----------	----------------	--------	------

hsa-miR-215-5p	113,663	-1,691	7,95E-05	0,103
hsa-miR-141-3p	114,541	-1,847	6,43E-04	0,418
hsa-miR-10b-5p	740,756	-0,671	1,10E-03	0,479
hsa-miR-122-5p	29797,272	1,842	2,98E-03	0,970
hsa-miR-141-5p	1,411	-3,546	6,65E-03	0,9998
hsa-miR-320d	107,301	-1,003	7,25E-03	0,9998
hsa-miR-34a-5p	35,278	0,853	7,68E-03	0,9998
hsa-miR-210-3p	11,604	0,963	9,70E-03	0,9998
hsa-miR-185-5p	2018,106	0,612	1,47E-02	0,9998
hsa-miR-155-5p	455,855	-0,403	2,49E-02	0,9998
hsa-miR-181a-2-3p	36,307	-0,574	0,0249	0,9998
hsa-miR-375-3p	227,362	-1,078	0,0250	0,9998
hsa-miR-885-3p	8,850	1,534	0,0270	0,9998
hsa-miR-95-3p	22,591	-0,718	0,0291	0,9998
hsa-miR-431-5p	139,028	-0,791	0,0297	0,9998
hsa-miR-369-5p	34,691	-0,746	0,0306	0,9998
hsa-miR-326	75,337	0,857	0,0368	0,9998
hsa-miR-6843-3p	1,561	2,051	0,0369	0,9998
hsa-miR-10a-5p	603,000	-0,365	0,0371	0,9998
hsa-miR-6842-3p	4,208	1,294	0,0375	0,9998
hsa-miR-3620-3p	1,298	2,093	0,0381	0,9998
hsa-miR-1273h-3p	11,623	1,031	0,0400	0,9998
hsa-miR-485-5p	9,737	-0,853	0,0402	0,9998
hsa-miR-548bc	1,629	2,647	0,0433	0,9998
hsa-miR-873-5p	3,398	-1,367	0,0438	0,9998
hsa-miR-185-3p	27,392	0,652	0,0452	0,9998
hsa-miR-328-3p	214,261	0,568	0,0486	0,9998
hsa-miR-181a-5p	1290,990	-0,597	0,0490	0,9998

Para essa análise também foi realizada uma integração de rede. Os microRNAs com maiores taxas de interação foram os mir-34a e mir-10a. As principais vias moleculares identificadas nessa comparação foram: resposta a citocina, diferenciação de células T, regulação das vias ATR, apoptose, envelhecimento, regulação de células

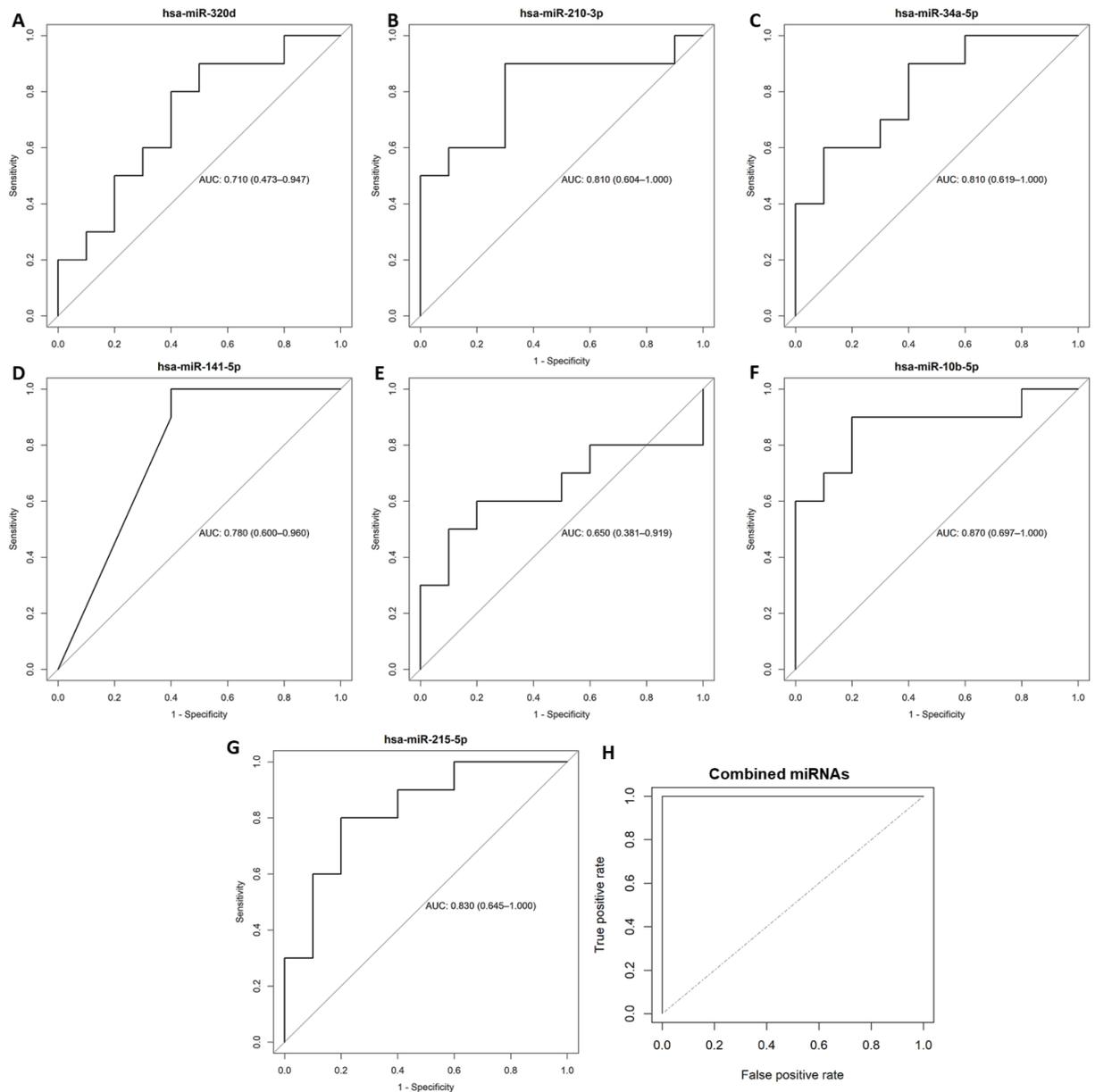
tronco, permeabilidade da barreira hematoencefálica, resposta à hipóxia, resposta imune e hepatotoxicidade (Tabela 14) (222).

**Tabela 14.** Vias moleculares afetadas pelos microRNAs diferencialmente expressos na comparação pacientes versus controle, para amostras provenientes de EVs.

<b>Vias</b>	<b>microRNAs totais</b>	<b>microRNAs identificados</b>	<b>Pval</b>
Resposta a Citocinas	14	4	6,43e-05
Diferenciação de Células T- helper	56	6	0,000246
Regulação da via ATR	5	2	0,00295
Osteoclastogênese	18	3	0,00333
Desenvolvimento de Condrócitos	44	4	0,00623
Apoptose	179	8	0,00724
Envelhecimento	182	8	0,00804
Regulação de Células Tronco	183	8	0,00833
Diferenciação de Células T	48	4	0,00853
Permeabilidade da Barreira Hematoencefálica	9	2	0,0102
Disfunção Mitocondrial	9	2	0,0102
Diferenciação de Células do Músculo Liso	27	3	0,0108
Desenvolvimento Neurônico	28	3	0,012
Resposta a Hipóxia	34	3	0,0204
Resposta Imune	176	7	0,025
Ciclo Celular	178	7	0,0265
Diferenciação de megacariócitos	15	2	0,0278
Diferenciação Condogênica	18	2	0,0393
Hepatotoxicidade	18	2	0,0393
Senescência Celular	21	2	0,0522

Os microRNAs observados para EVs foram comparados com os de plasma total a fim de verificar semelhanças entre as expressões dessas moléculas nas duas análises. Todos os microRNAs identificados em EVs foram identificados na análise de plasma total, porém, com significâncias diferentes. Apenas quatro microRNAs foram estatisticamente significativos em ambas as análises: mir-215, mir-141, mir-328 e mir-181. Todas as moléculas apresentaram mesmo padrão de expressão (hipo ou hiperexpressos) em todas as amostras.

Por fim, através de aprendizado de máquinas, foi realizada uma análise de predição fenotípica das amostras. Os microRNAs, individualmente, apresentam bom poder preditivo, com área abaixo da curva de, pelo menos, 0,65 (Figura 25 A-G). Contudo, devido à complexidade do AVC, avaliamos se uma associação entre um ou mais microRNAs poderia aumentar essa predição. Dessa forma, verificamos que uma combinação de 7 microRNAs prediz corretamente as amostras entre caso e controle (Figura 25H). Essa combinação inclui a hiperexpressão dos microRNAs mir-122-5p, mir-mir-210-3p e mir-34a-5p e a hipoexpressão dos microRNAs mir-10b-5p, mir-215-5p, mir-141-5p e mir-320d. Vale ressaltar que o pequeno número amostral é um problema e pode causar erros falsos-positivos.



**Figura 25** - Análise de predição fenotípica dos microRNAs identificados para EVs. Os microRNAs considerados nessa análise foram os que apresentaram valor de  $p$  menor que 0,01. **A-G)** Valores de predição individualmente para cada microRNA selecionado. **H)** Valor de predição combinada entre os sete microRNAs selecionados: mir-122-5p, mir-10b-5p, mir-215-5p, mir-141-5p, mir-210-3p, mir-320d e mir-34a-5p. A predição, com essa combinação, foi considerada perfeita, porém, necessita maiores validações para evitar falsos-positivos.

#### 4. Discussão

Vesículas extracelulares são responsáveis pela comunicação intercelular, gerando respostas locais e sistêmicas a condições fisiológicas específicas (69). Quando

liberadas pelas células, elas possuem moléculas compartimentalizadas com funções sinalizadoras, regulatórias ou codificantes, que agem de forma causal ou protetora nas células alvo (66,69,72). Com isso, as EVs possuem direta influência sobre um fenótipo e apresentam relevante poder na identificação de biomarcadores moleculares circulantes. De forma geral, as EVs agem protegendo as moléculas, principalmente pequenos RNAs e proteínas, da degradação extracelular (302,303).

Nessa análise observamos microRNAs presentes em EVs semelhantes ao encontrados na análise de plasma total, simbolizando que esta última inclui tanto molécula livres quanto associadas a proteínas ou EVs. Discutimos aqui, os microRNAs que apresentaram significância estatística em ambas as análises, com coerência dos níveis de expressão.

Como descrito na seção anterior, a hipoexpressão do microRNA mir-215 foi identificada em pacientes na fase aguda para a nossa casuística de plasma total. A compartimentalização em plasma deste microRNA na fase crônica da doença indica que ele possui influência ativa, e sistêmica, na fisiologia de recuperação do AVC. Apesar do mir-215 apresentar funções benéficas para o AVC, como inibição de apoptose e melhora dos déficits, na nossa análise ele aparece hipoexpressos, sugerindo agravamento do AVC. A hipoexpressão dessa molécula na nossa casuística, seja na fase aguda ou crônica, sugere que outros fatores clínicos e ambientais dos pacientes, sejam fatores de risco, dieta ou outras doenças concomitantes, possam influenciar o prognóstico do AVC.

Os microRNAs mir-185, mir-122, mir-141, mir-181 e mir-328, por sua vez, possuem mecanismos com menor risco para ocorrência ou gravidade do AVC. A regulação da angiogênese, por exemplo, é um processo comum a todos esses microRNAs (304–312).

Os microRNAs mir-185 e mir-122 foram os mais frequentes identificados na análise. Eles estão relacionados com proteção contra morte neuronal e regulação do sistema imune (124,313). O mir-185 foi descrito como um potencial biomarcador para AVC isquêmico cardioembólico (314). Isso é relevante já que metade das amostras avaliadas nesse momento possuem essa etiologia.

A hipoexpressão do microRNA mir-141 está descrito como redutor da morte celular, aumentando processos angiogênicos e a tolerância celular para a falta de

oxigenação (309,315). Baixos níveis de mir-181 também estão associados com redução da morte celular e área de infarto, com consequente melhora dos déficits neuronais (316).

Os microRNAs identificados nessa análise foram identificados a partir de EVs obtidas de plasma de pacientes na fase crônica do AVC, ou seja, em estágio de recuperação dos déficits. Esse pode ser um fator relevante para a interpretação dos dados, já que a maioria dos microRNAs observados apresentam mecanismos benignos para a fisiologia do AVC. Contudo, o mir-215 pode representar a variabilidade de recuperação dos pacientes, conforme mostrada na avaliação das escalas de NIHSS dos pacientes na fase crônica.

A análise de predição fenotípica realizada nos mostrou que, separadamente, os microRNAs possuem coeficientes acima de 0,65, indicando que eles possuem potencial relevância na classificação do AVC. Ao se realizar uma análise conjunta desses microRNAs expressos para a doença, foi possível predizer com 100% de eficiência a classificação das amostras analisadas. Contudo, o pequeno número amostral gera uma tendência a criar dados falsos-positivos, o que deve ser consertado com uma casuística maior. Entretanto, apesar da baixa confiabilidade nos coeficientes de predição, é possível concluir que um conjunto de microRNAs apresenta uma influência maior no AVC, do que cada molécula de forma isolada. Esse fato condiz com a complexidade e multifatorialidade da doença, a qual sofre influência de diferentes mecanismos fisiopatológicos.

## **5. Considerações Finais**

Essa análise buscou identificar biomarcadores de microRNAs observados associados com EVs circulantes em plasma.

- Identificamos 28 microRNAs diferencialmente expressos em EVs entre pacientes e controles, dentre os quais podemos citar os microRNAs mir-215, mir-122, mir-185, selecionados com base na relação fisiológica com o AVC isquêmico. Essas moléculas estão relacionadas com regulação da apoptose, angiogênese e proteção contra morte neuronal.

- Na comparação entre os microRNAs identificadas para plasma total e EVs, quatro moléculas apresentaram expressão diferencial similar entre as análises: mir-215, mir-141, mir-328 e mir-181a. Esses microRNAs apresentam provável relação protetora contra danos isquêmicos e morte celular, com melhora do prognóstico dos pacientes. De forma geral, os microRNAs identificados tanto para plasma total quanto para EVs apresentaram similaridade nas expressões e estatística, tornando-se potenciais biomarcadores para a doença.

## CAPÍTULO III – METABOLÔMICA

### **1. Objetivos do Capítulo**

#### *Geral*

Determinar o padrão de expressão de metabólitos circulantes em pacientes com AVC isquêmico nas fases aguda e crônica da doença.

#### *Específicos*

- i. Determinar o padrão de expressão de metabólitos circulantes que ajam como biomarcadores para a fase aguda do AVC aterosclerótico.
- ii. Determinar o padrão de expressão de metabólitos circulantes que ajam como biomarcadores para a fase crônica do AVC aterosclerótico.
- iii. Identificar mecanismos moleculares associados aos metabólitos identificados para cada fase do AVC isquêmico.

### **2. Métodos**

#### *2.1. Casuística*

Para a identificação de metabólitos de interesse, foram analisadas amostras de plasma de 19 pacientes com AVC isquêmico aterosclerótico na fase aguda, 19 pacientes com AVC isquêmico aterosclerótico na fase crônica e 14 indivíduos controles, sem AVC ou estenose de carótidas. A metodologia de coleta foi semelhante à casuística dos RNAs não codificantes: os pacientes em fase aguda foram coletados em até 24 horas após o início dos sintomas, os pacientes em fase crônica foram coletados após 3 meses do ictus do evento. Os indivíduos controles realizaram exames de clínicos e de neuroimagem, como ressonância e doppler de carótidas, para a comprovação da ausência de AVC ou placas ateroscleróticas. Os pacientes foram selecionados de acordo com a etiologia do AVC, sendo que todos apresentam classificação do evento como aterosclerose de grandes artérias. Os diagnósticos de AVC foram realizados pela equipe médica responsável, sendo comprovados através de exames de tomografia, ressonância magnética e doppler de carótidas.

Todos os indivíduos foram coletados no Hospital das Clínicas da UNICAMP, de modo que os pacientes em fase aguda foram coletados na UER do Hospital, enquanto os pacientes em fase crônica e os indivíduos controles, foram coletados ambulatorialmente, nos ambulatórios de neurovascular e de hipertensão, respectivamente. Todos os pacientes concordaram com a pesquisa e assinaram o TCLE, aprovado pelo comitê de ética da UNICAMP (CAAE: 12112913.3.0000.5404/Parecer: 257.020).

As amostras de sangue foram mantidas em gelo por até 2 horas após a coleta, a fim de preservar as moléculas circulantes de interesse (209). Foram então processadas via centrifugação por 10 minutos a 2500rpm a 4°C (163). O plasma foi separado dos leucócitos, aliquotado em microtubos de 1,5mL e armazenados a -80°C até o momento de uso. O nível de hemólise dessas amostras foi avaliado através da medida de absorbância da hemoglobina em 414nm pelo equipamento Epoch (Biotec Inc) (210,211).

## 2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Essa análise foi realizada em colaboração com um estudo de iniciação científica desenvolvido no grupo pelo aluno Douglas C. da Rosa. A análise por espectroscopia de RMN foi realizada no Laboratório de Química Biológica, no Instituto de Química da UNICAMP, sob colaboração com a Profa. Dra. Ljubica Tasic.

As amostras de plasma foram diluídas em proporção 1:1 em solução de ácido trimetilsililpropanóico (TMSP) em água deuterada (D<sub>2</sub>O; Cambridge Isotope Laboratories, Inc.). As amostras foram randomizadas por corrida, de modo que cada conjunto de leituras espectroscópicas continham pelo menos uma amostra de cada grupo. As análises ocorreram por RMN de próton (<sup>1</sup>H-RMN) no equipamento Avance III de 600 MHz (Bruker Inc.) utilizando sonda TBI (do inglês *triple resonance broadband inverse*) e à temperatura ambiente (298 K).

Para esse estudo exploratório, foram utilizados espectros unidimensionais (1D) obtidos através das sequências de pulsos CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), a fim de identificar moléculas pequenas ( $\leq 1,5$ kDa).

Os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN gerados pelo espectroscópio foram padronizados utilizando o software MestreNova (MestreLab Research) (317), através de ajustes finos de fase e base dos mesmos (318). O ácido láctico foi utilizado como deslocamento químico de referência (1,324 ppm) e foi realizado um *binning* de 0,004 ppm (319). Os espectros foram normalizados por área total para as análises quimiométricas.

Os deslocamentos químicos referentes à água e à molécula de EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético; coagulante proveniente dos tubos de coleta de sangue) foram retirados do espectro visando evitar contaminações nas identificações dos metabólitos (Tabela 15). Os dados foram avaliados quanto à qualidade, diferenças estatísticas e seleção de variáveis utilizando o software MetaboAnalyst 4.0 (320). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $p$ -valor < 0,05) e corrigidos para múltiplos testes pelo teste Benjamin-Hochberg. Foi realizada uma análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), com seleção de variantes de importância na projeção (VIP) maiores que 1 (321).

**Tabela 15.** Deslocamentos químicos referentes às moléculas de água e EDTA excluídas dos espectros

<b>Molécula</b>	<b>Deslocamento Químico (ppm)</b>
Ca <sup>2+</sup> -EDTA	2,533 – 2,581
Mg <sup>2+</sup> -EDTA	2,673 – 2,713
EDTA, Ca <sup>2+</sup> -EDTA, Mg <sup>2+</sup> -EDTA	3,001 – 3,261
EDTA	3,553 – 3,625
Água	4,4 – 5,10

As variantes selecionadas foram comparadas com o Bando de Dados do Metaboloma Humano (HMDB - <https://hmdb.ca/>) (322).

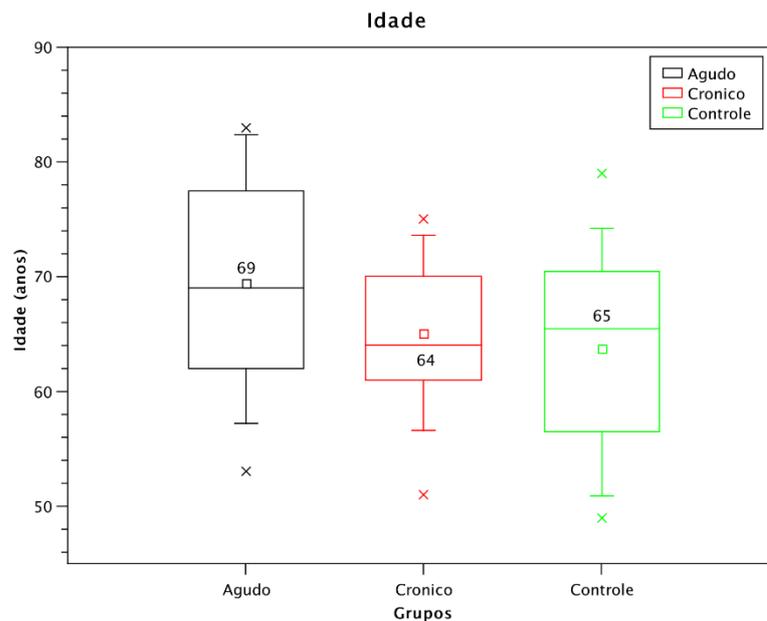
### 3. Resultados

#### 3.1. Casuística

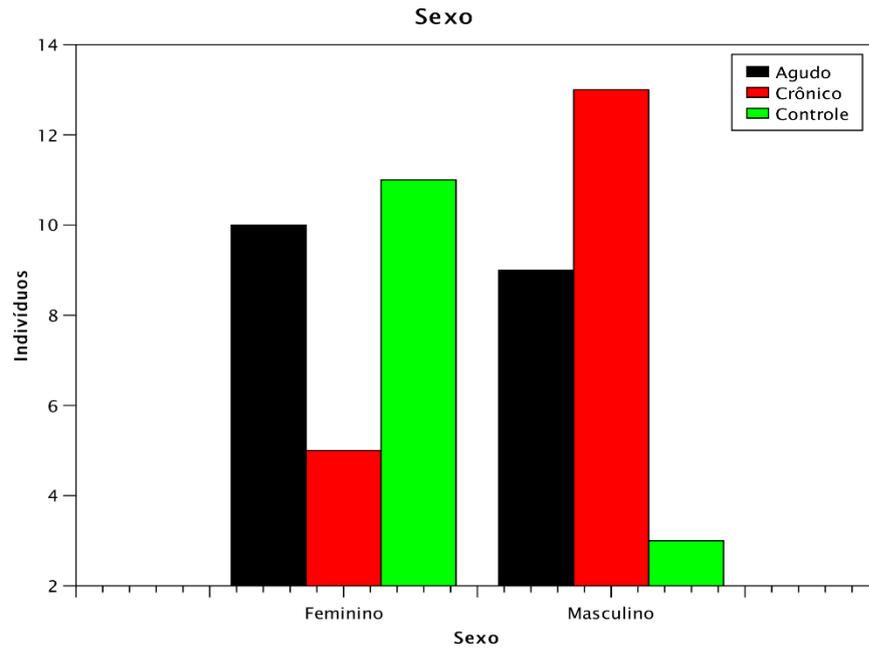
As amostras utilizadas nessa casuística assemelham-se às utilizadas para a identificação de microRNAs como biomarcadores de AVC isquêmico. Foram utilizadas apenas amostras de pacientes com AVC isquêmico do subtipo aterosclerótico.

Nas figuras 26 a 28, mostramos uma caracterização da casuística quanto à idade, sexo e principais fatores de risco, respectivamente.

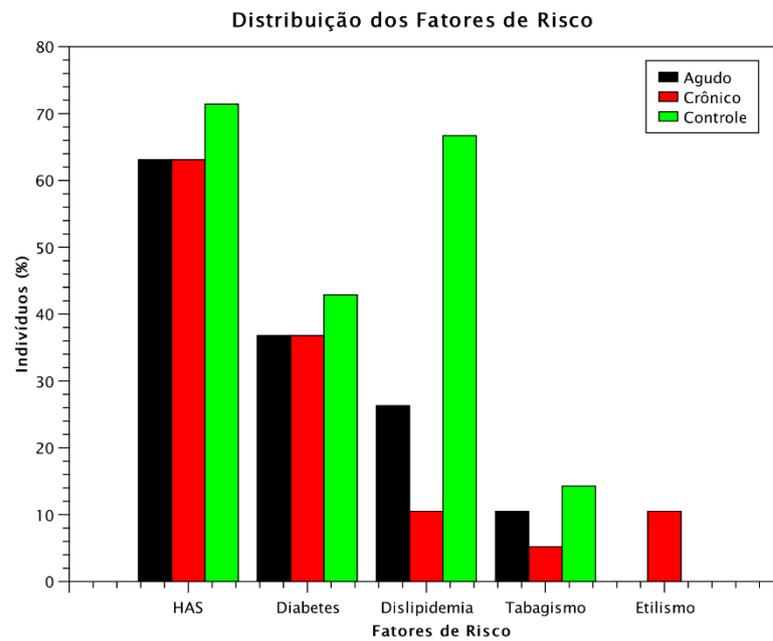
Na figura 29, mostramos a dispersão das escalas de NIHSS por amostra nas fases aguda e crônica do AVC. Observamos pacientes com maior gravidade do evento na fase aguda. Entretanto, os pacientes na fase crônica não apresentaram melhora completa dos déficits.



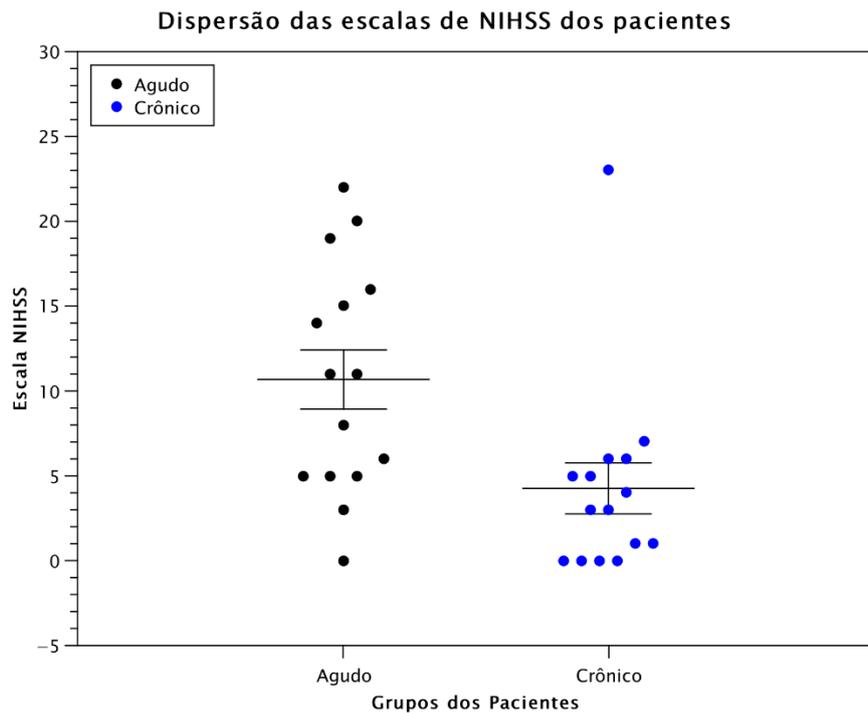
**Figura 26.** Distribuição da idade dos pacientes e controles analisados na casuística de análise de dados metabólicos.



**Figura 27.** Distribuição do sexo dos pacientes e controles analisados para o estudo de metabólômica.



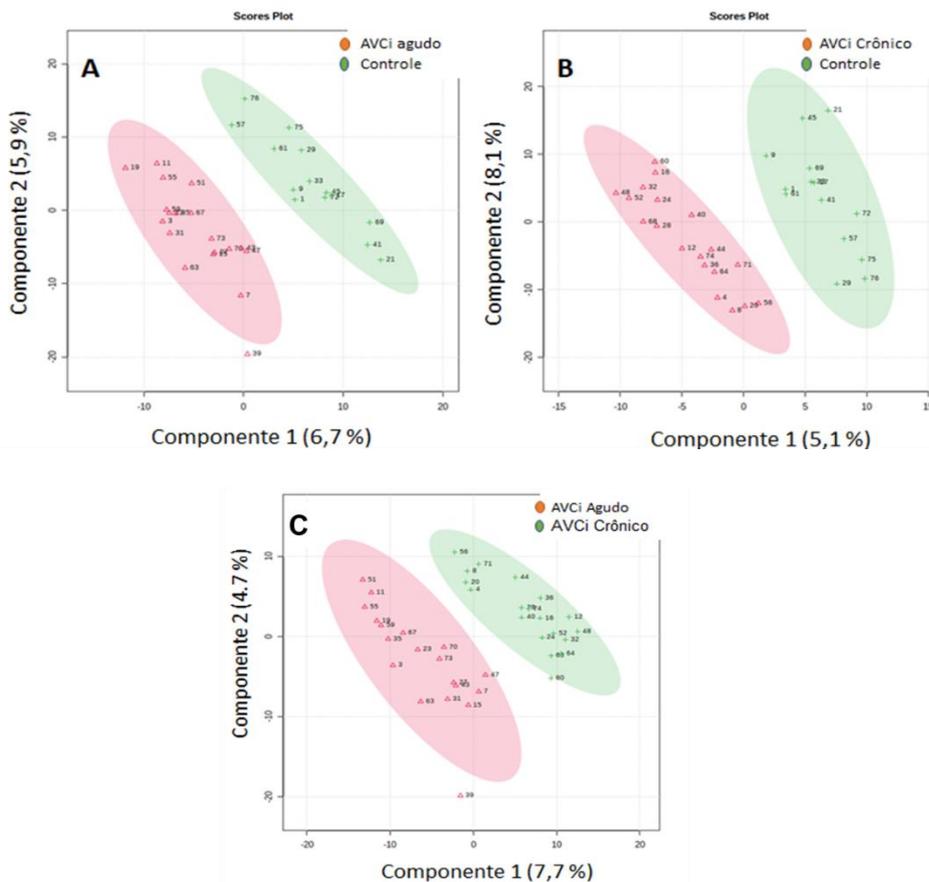
**Figura 28.** Distribuição dos principais fatores de risco para AVC isquêmico na casuística de pacientes e controles analisados para metabólômica.



**Figura 29.** Caracterização das amostras dos pacientes com AVC isquêmico aterosclerótico com base nas escalas de NIHSS por grupo.

### 3.2. Espectroscopia de RMN

Pela análise de PLS-DA, podemos observar que há uma separação entre os grupos de pacientes e controles, de modo que os metabólitos são aptos para diferenciar os grupos (Figura 30). Contudo, a análise de componentes possui baixos valores preditivos, o que pode ser devido ao pequeno número e alta variabilidade amostral do estudo.



**Figura 30.** Análise PLS-DA para as comparações realizadas entre casos e controles. É possível verificar uma classificação entre os grupos, porém, com baixo poder preditivo. **A)** Grupo de pacientes com AVC na fase aguda e Controles; **B)** Grupo de pacientes com AVC na fase crônica e Controles; **C)** Comparação entre AVC na fase aguda e AVC na fase crônica.

Através dos principais VIPs, selecionamos os metabólitos que apresentaram diferenças de expressão entre os grupos.

A comparação entre os grupos de AVC na fase aguda e indivíduos controles identificou níveis aumentados de piruvato, formato, GlycA (que engloba a região de glicoproteínas e glucosamina N-acetiladas), succinato, trimetilamina, dimetilglicina, manose e leucina para o grupo de pacientes. Em contrapartida, os níveis de arginina, lisina, citrato, glutamina, GlycB (grupos acetilas de ácido N-acetilneuramínico), isoleucina, metionina, serina, tirosina e ureia encontravam-se reduzidos nos pacientes (Tabela 16).

**Tabela 16.** Relação de metabólitos identificados na comparação entre AVC na fase aguda e controles. Os valores listados de *fold change* (FC), VIP e p-valor estão descritos de acordo com cada deslocamento químico do metabólito.

Metabólito	Log2 (FC)	Deslocamentos Químicos	Valor VIP	p-valor
Acetato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Arginina	-0,48; -0,42;	1,894; 1,898;	1,74; 1,76;	0,042; 0,067;
	-0,45; -0,65	1,918; 1,926	1,88; 1,94	0,002; 0,032
Citrato	-0,55	2,638	2,15	0,015
Dimetilglicina	0,69	2,902	2,7	0,003
Formato (ácido fórmico)	4,49; 3,03;	8,443; 8,447	1,45; 1,92;	0,019; 0,005;
	3,36; 23,45	8,451; 8,455	1,78; 1,71	0,005; 0,004
Glutamato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glutamina	1,00; -0,46;	2,138; 2,142;	2,28; 1,78;	0,026; 0,064;
	-0,61; -0,59	2,146; 2,150	2,12; 1,93	0,025; 0,055
GlycA	0,9	2,026	2,07	0,038
GlycB	-0,63; -0,51;	2,046; 2,054;	2,12; 1,92;	0,019; 0,065;
	-0,58; -0,53;	2,062; 2,066;	2,29; 2,34;	0,016; 0,013;
	-0,50	2,070	1,91	0,046
Isoleucina	-0,50; -0,35;	0,910 <sup>t</sup> ; 0,926 <sup>t</sup> ;	2,00; 1,66;	0,029; 0,071;
	-0,26; -0,49	0,930 <sup>t</sup> ; 0,942 <sup>t</sup>	1,66; 2,09	0,086; 0,027
Leucina	0,63; 0,82;	0,942; 0,946;	2,09; 1,76;	0,027; 0,066;
	0,86	0,962	1,86	0,098
Lisina	-0,48; -0,42;	1,894; 1,898;	1,74; 1,76;	0,042; 0,067;
	-0,45; -0,65	1,918; 1,926	1,88; 1,94	0,002; 0,032
Manose	0,84	3,942	2,17	0,022
Metionina	1,00; -0,46;	2,138; 2,142;	2,28; 1,78;	0,026; 0,064;
	-0,61; -0,59	2,146; 2,150	2,12; 1,93	0,025; 0,055
Piruvato	1,11	2,366	2,34	0,013

Serina	-0,67; -0,58;	3,974; 3,978;	2,09; 1,85;	0,027; 0,053;
	-0,69; -0,83	3,982; 3,986	2,03; 2,49	0,033; 0,007
Succinato	1,21	2,398	2,34	0,014
Tirosina	-0,84	7,175	1,32	0,098
Trimetilamina	0,58; 0,72;	2,886; 2,890;	2,20; 2,86;	0,012; 0,002;
	0,65	2,894	2,14	0,023
Ureia	-1,08; -0,75;	5,755; 5,759;	2,47; 1,79;	0,011; 0,046;
	-1,08; -0,90;	5,763; 5,767;	2,29; 2,09;	0,014; 0,023;
	-0,89; -1,33;	5,771; 5,775;	1,85; 2,91;	0,038; 0,003;
	-0,89; -1,12;	5,779; 5,783;	1,99; 2,46;	0,032; 0,011;
	-1,04	5,787	1,74	0,029

Para a comparação entre AVC na fase crônica e indivíduos controles, os casos apresentaram níveis aumentados de succinato, trimetilamina, dimetilglicina, manose, leucina, isoleucina, glutamato e serina, e níveis reduzidos de ureia e acetato (Tabela 17).

**Tabela 17.** Relação de metabólitos identificados na comparação entre AVC na fase crônica e controles. Os valores listados de *fold change* (FC), VIP e p-valor estão descritos de acordo com cada deslocamento químico do metabólito.

Metabólito	Log2 (FC)	Deslocamento Químico	Valor VIP	p-valor
Acetato	-0,73	1,91	1,83	0,071
Arginina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Citrato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dimetilglicina	0,72;	2,902; 2,906	3,02;	0,002;
	0,53		1,78	0,083
Formato (ácido fórmico)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

			3,33;	0,001;
	0,97; 0,70;	2,322; 2,326;	2,69;	0,007;
Glutamato	0,70; 0,56;	2,330; 2,334;	2,63;	0,008;
	0,88	2,338	2,38;	0,018;
			3,07	0,002
Glutamina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GlycA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GlycB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Isoleucina	0,54; 0,37;	0,914 <sup>t</sup> ; 0,918 <sup>t</sup> ;	2,64;	0,008;
	0,64	1,006 <sup>d</sup>	1,62;	0,042;
			2,01	0,049
Leucina	0,62	0,962	2,02	0,09
Lisina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Manose	0,53; 0,65;	3,926; 3,930;	1,92;	0,060;
	0,57	3,934	2,47;	0,005;
			2,31	0,007
Metionina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Piruvato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Serina	0,77; 0,35;	3,942; 3,958;	2,68;	0,007;
	-0,52	3,986	1,66;	0,060;
			2,03	0,046
Succinato	0,49331	2,398	1,18	0,065
Tirosina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Trimetilamina	0,72; 0,75;	2,886; 2,890;	2,65;	0,004;
	0,72; 0,79	2,894; 2,898	2,85;	0,002;
			2,44;	0,015;
			2,60	0,009

			2,29;	0,046;
			2,42;	0,038;
	-1,05; -0,89;	5,735; 5,743;	2,52;	0,042;
	-0,87; -0,60;	5,747; 5,755;	2,12;	0,044;
Ureia	-0,71; -0,64;	5,759; 5,763;	2,16;	0,040;
	-0,78	5,783	2,01;	0,056;
			2,45	0,042

---

Observamos que os metabólitos dimetilglicina, leucina, manose, succinato, trimetilamina e ureia foram encontrados, com níveis alterados semelhantes, em ambos os grupos de pacientes, tanto na fase aguda quanto crônica. Em contrapartida, os metabólitos serina e isoleucina foram identificados para os grupos de pacientes, porém, com expressão inversa entre as fases aguda e crônica da doença.

#### 4. Discussão

A metabolômica é um estudo relevante para a interpretação funcional de mecanismos alterados em doenças, considerando que é uma das etapas finais de expressão gênica.

Nesse estudo, observamos que as análises de componentes apresentaram boas separações entre os grupos, de modo que os metabólitos são aptos para a classificação fenotípica, apesar de apresentar baixos poderes preditivos. Estes, entretanto, podem ter sido afetados pelo pequeno número amostral para análise de doenças complexas, como o AVC.

A partir da identificação de variantes com potencial impacto no fenótipo, preditas pelo software MetaboAnalyst, identificamos metabólitos exclusivos e comuns às fases aguda e crônica do AVC isquêmico. As moléculas identificadas em ambas as fases, indicam relação com a fisiologia da doença em si. Dentre eles, dimetilglicina, leucina, manose, succinato e trimetilamina foram observados aumentados nos pacientes, em relação aos controles, enquanto a ureia, encontrou-se reduzida na mesma comparação.

Esses metabólitos estão relacionados com aumento dos danos cerebrais, processos inflamatórios e estresse oxidativo (323–326). Esses mecanismos são comumente associados à fisiopatologia do AVC.

Durante eventos isquêmicos, já foram observados depósitos de manose em células do endotélio, com conseqüente ativação do sistema complemento (323). Esse mecanismo leva ao aumento da inflamação, coagulação sanguínea e permeabilidade vascular, afetando a resposta hemodinâmica cerebral e gerando uma piora dos danos causados pela isquemia (323,324,327–329). Tratamentos *in vivo* utilizando a inibição de manose mostraram uma melhora do prognóstico do AVC, com evolução das funções vasculares (323,324).

Succinato é um metabólito do ciclo de Krebs descrito como uma assinatura de eventos isquêmicos (325). Ele é responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria, gerando estresse oxidativo inespecífico durante reperfusão isquêmica (325). Tratamentos utilizando a redução de succinato no tecido demonstraram uma melhora da reperfusão, reduzindo os danos causados pela isquemia (325).

Por sua vez, trimetilamina é um metabólito associado com a microbiota intestinal, campo que vem mostrando grande relevância na ocorrência e associados à mecanismos de doenças neurológicas (326,330,331). Alguns estudos relatam a influência desse metabólito de forma neuroprotetora contra isquemia, ou como possivelmente causal para desregulação da homeostase celular (326,332,333). Altos níveis de trimetilamina foram descritos como precursores da aterosclerose, reatividade plaquetária e inflamação, agindo como preditor de risco para doenças cardiovasculares (326).

Nessa análise verificamos também a presença de metabólitos específicos para cada fase do AVC, simbolizando processos moleculares característicos para a evolução da doença.

Na fase aguda, observamos níveis aumentados de piruvato, formato e GlycA. Essas moléculas estão associadas com processos de metabolismo energético, acidose metabólica e processos inflamatórios (137,334,335).

O piruvato faz parte do metabolismo energético pela via glicolítica anaeróbica (137). Seus níveis aumentados simbolizam uma priorização por respiração celular durante período de deficiência na oxigenação tecidual, correlacionando com a fase aguda do AVC (137). De modo geral, a presença de piruvato tem sido associada com efeitos benéficos contra danos isquêmicos através da redução de moléculas inflamatórias, como citocinas, e da desativação das células da micróglia (336–340).

Serina, isoleucina e citrato são metabólitos presentes, direta e indiretamente, no metabolismo energético e encontram-se reduzidos nos pacientes na fase aguda do AVC. Serina é um metabólito pertencente ao metabolismo dos aminoácidos, e precursor de piruvato (85,341). Devido a isso, eles apresentam níveis inversamente proporcionais, fato que condiz com os achados nessa análise. A redução desse metabólito em soro de pacientes com AVC isquêmico foi identificada por Liu et al (2017) como um potencial biomarcador da fase aguda do evento (85). Junto com isoleucina, a serina participa de diversos processos celulares, como reparo e manutenção das funções cerebrais (85,342). Isoleucina e citrato estão associados com o ciclo energético anaeróbico (ou ciclo de Krebs), de modo que a redução dos níveis desses metabólitos na fase aguda do AVC corroboram com o aumento dos níveis de piruvato, associando-se com condições de hipóxia tecidual (85,137). O aumento dos níveis dessas moléculas na fase crônica do AVC condiz com processos de melhora dos danos isquêmicos e recuperação tecidual.

Aumento dos níveis de piruvato e formato foram observados por Jung et al (2011) em estudo de AVC isquêmico por oclusão de pequenos vasos, de modo que eles foram classificados como possíveis fatores de risco para esse AVC (137). Níveis aumentados de formato foram relacionados com o metabolismo do ácido fólico, resultando em hiperhomocisteínemia, uma condição de risco para o desenvolvimento de aterosclerose e AVC (137). Essa condição também pode causar acidose metabólica nos pacientes após o evento isquêmico, agravando o quadro clínico dos pacientes (137,343).

Esse quadro metabólico também ocasiona a redução de metionina, um dos precursores de formato, conforme observado nas nossas análises, resultando em redução na síntese de poliamidas (137,344,345). As poliaminas foram descritas como envolvidas em processos de sobrevivência e proliferação celular, envelhecimento, resistência a estresse e regulação da inflamação (344,346). Uma redução dessas

moléculas, resultante da diminuição de metionina e aumento de formato, tende a gerar uma regulação do sistema imune e do estresse oxidativo ineficiente, agravando o quadro clínico dos pacientes na fase aguda do AVC (344).

Outro processo celular envolvido na fase aguda do evento isquêmico é a inflamação. As moléculas glicoproteínas e glucosaminas N-acetiladas (indicadas como GlycA) apresentaram sinais elevados na nossa casuística da fase aguda, simbolizando o aumento de processos inflamatórios nesses pacientes (334,335,347). Além disso, GlycAs já foram descritas como relacionadas ao aumento plaquetário, resultando na formação de eventos trombóticos e ateroscleróticos, gerando complicações nos eventos isquêmicos (348,349).

Com relação aos metabólitos com níveis reduzidos para a fase aguda da isquemia, além de serina, isoleucina, metionina e citrato, já descritos acima, podemos citar a glutamina. Considerando que citrato é um de seus precursores, através do ciclo de Krebs, é coerente que seus níveis estejam correlacionados.

Glutamina é um importante metabólito associado com diversos processos celulares, como síntese de proteínas e nucleotídeos, sistema imune e regulação neuronal do sistema nervoso central (350). Níveis reduzidos desse metabólito foram associados com o aumento da proteína fibrilar ácida da glia (GFAP), um indicador de danos cerebrais (137). Esse fato corrobora com os achados nesse estudo, já que a redução desse metabólito foi identificada na fase aguda do AVC, em contrapartida com seus níveis aumentados na fase crônica, quando os danos cerebrais tendem a estar amenizados.

Glutamina e glutamato fazem parte dos metabolismos glicolíticos e de neurotransmissores, estando associados com a fisiologia do AVC (350–356). O glutamato faz parte da sinalização glutamaérgica, já associada com morte neuronal e danos cerebrais durante o AVC isquêmico (354,356,357). Apesar de ser o neurotransmissor mais frequente no cérebro, excesso de glutamato está relacionado ao aumento de neurotoxicidade, danos neuronais e neurodegeneração (354,356,357). Quantidades elevadas de glutamato foram identificadas nos pacientes em fase crônica da nossa casuística. Apesar da tendência ser a completa redução dos danos isquêmicos na fase crônica da doença, na nossa casuística observamos que os pacientes desse grupo ainda apresentam déficits significativos (NIHSS médio = 4).

Dessa forma, o aumento dos níveis de glutamato pode simbolizar a presença de déficits nesses pacientes, resultado de uma variabilidade amostral.

É importante ressaltar que, para esse grupo de pacientes, também identificamos microRNAs diferencialmente expressos que apresentam funções associadas a piora de prognóstico e aumento dos danos isquêmicos, como o mir-206 e o mir-215, nas análises de plasma total e de vesículas extracelulares, respectivamente.

De modo geral, os mecanismos identificados na análise metabolômica de plasma dos pacientes com AVC isquêmico se correlacionam com a fisiologia da doença e com os achados em outras análises, como as de microRNAs circulantes.

## **5. Considerações Finais**

Na análise metabolômica realizada, identificamos metabólitos e mecanismos moleculares condizentes com a fisiopatologia do AVC.

- Identificamos os seguintes metabólitos com expressão exclusiva para a fase aguda do AVC isquêmico, quando comparado com controles: o aumento nos níveis de piruvato, formato e GlycA e uma redução nos níveis de glutamina.
- Para a fase crônica do AVC isquêmico, identificamos um aumento nos níveis de glutamato nos pacientes, quando comparado com controles.
- Nessa análise observamos mecanismos moleculares específicos e condizentes com cada estágio do AVC isquêmico. Metabólitos identificados em ambas as fases do AVC apresentam processos associados com a fisiopatologia, ocorrência e evolução do AVC nos pacientes, incluindo danos cerebrais, permeabilidade vascular e estresse oxidativo. Em específico para cada fase da doença, a fase aguda possui metabólitos associados com processos inflamatórios, agregamento plaquetário, metabolismo anaeróbico e aumento dos danos teciduais causados pelo processo isquêmico. Na fase crônica, por sua vez, observamos alterações nos níveis de glutamato, possivelmente responsável por pior danos cerebrais e neurotoxicidade nos pacientes, o que pode ser explicado pela variabilidade de prognósticos desse grupo.

## DISCUSSÃO GERAL

Neste estudo observamos a presença de variantes genéticas associadas com a fisiopatologia do AVC, com base em diferentes objetivos moleculares.

Inicialmente, buscamos por variantes que estivessem associada à genes candidatos ao risco de desenvolvimento de AVC nos pacientes. Devido à condição multifatorial do AVC, visamos a identificação de variantes de baixa frequência populacional, e alta frequência na nossa casuística, que pudessem representar a herdabilidade não identificada da doença, contribuindo para o aumento do seu risco.

Com essa estratégia, identificamos variantes em genes de interesse para o AVC, como *COL4A3*, *COL6A3*, *FGFR2*, *FVIII*, *HLA-B*. Esses genes integram, individualmente, vias moleculares de interesse, como biossíntese de colágeno, angiogênese, integridade vascular, coagulação sanguínea e processos inflamatórios (172,182,183,205,207). Contudo, com uma análise de rede utilizando os genes alterados na análise de exoma, observamos a maioria das vias alteradas associadas ao sistema imune e sinalização celular. Isso propõe que as variantes identificadas nessa análise podem gerar um aumento do risco de ocorrência e na gravidade do AVC isquêmico nesses pacientes.

No caso da identificação de moléculas circulantes como biomarcadores, foi possível observar um padrão de mecanismos alterados em cada fase do AVC.

Identificamos mecanismos associados com inflamação, estresse oxidativo e danos cerebrais na análise de metabólitos, tanto em pacientes na fase aguda quanto na crônica. Dentre os microRNAs identificados para ambas as fases do AVC, também observamos moléculas descritas como biomarcadores de processos isquêmicos. Isso simboliza que, independentemente do estágio de evolução da doença, há uma similaridade entre os processos fisiológicos associadas a ocorrência e recuperação do AVC.

Tanto para a análise de microRNAs quanto de metabólitos, identificamos moléculas associadas com mecanismos de inflamação, hipóxia, angiogênese, apoptose neuronal, estresse celular e manutenção de células vasculares alterados para a fase aguda do AVC (85,224–226,251–253,260,265,268,336,337,345,350). Esses achados condizem com a literatura e com a fisiologia da doença, simbolizando

que os microRNAs let-7, mir-182, mir-324 e os metabólitos piruvato, formato, serina, glutamina, isoleucina e GlycA são relevantes para a regulação e ativação da fase aguda do AVC.

Esses processos moleculares, além de serem característicos dessa fase da doença, podem gerar uma redução dos danos causados pelo AVC isquêmico (39,226,231,263,265,309,309). Na nossa casuística, verificamos que os pacientes avaliados na fase aguda apresentaram melhora significativa dos déficits após 3 meses do ictus do evento, de forma que a presença dos microRNAs e metabólitos alterados podem estar associados a esse fenótipo e apresentar um efeito benéfico aos pacientes, com redução da escala NIHSS na evolução do AVC.

Para o grupo de pacientes da fase crônica, observamos uma maior variabilidade no prognóstico após 3 meses do evento isquêmico, através da comparação da evolução da escala de NIHSS desses pacientes. Esse fato pode ser verificado nas moléculas e mecanismos alterados identificados nas nossas análises. Exclusivamente para a fase crônica, observamos um aumento na expressão do mir-34c, relacionado com processos de regeneração tecidual após isquemia, e um aumento nos níveis de glutamato, associado a neurotoxicidade, morte neuronal e danos cerebrais (298,356). Os microRNAs mir-215 e mir-206 também foram relacionados, na literatura, com piora dos déficits do AVC nos pacientes (227,292,357). Esses resultados contraditórios quanto à predição da evolução do AVC podem ser explicados por fatores clínicos dos pacientes e necessitam de maior atenção para análise e interpretação dos dados.

É importante ressaltar que também observamos uma similaridade entre os microRNAs identificados tanto para a análise de plasma total, quanto de microRNAs associados a EVs. Isso mostra que essas moléculas possuem alta influência na comunicação intercelular sistêmica, de modo que tendem a serem mais protegidas contra degradação extracelular quando presentes em compartimentos extracelulares.

Dessa forma, verificamos que há uma similaridade entre os processos, mecanismos e moléculas ativadas durante a fisiologia do AVC, de modo que estudos multiômicos podem ser a chave para identificar novos meios de diagnóstico, predição de prognóstico e tratamento dos pacientes.

É importante ressaltar que a alta variabilidade fenotípica dos pacientes e controles analisados nesse estudo pode interferir na relevância estatística dos resultados, o que se torna uma importante limitação do trabalho. Entretanto, apesar de este ser um estudo exploratório e unicêntrico, foi possível identificar variantes de interesse para a fisiopatologia da doença e que podem auxiliar nas estratégias de identificação de fatores de predisposição, novos métodos diagnósticos e de tratamento do AVC isquêmico.

## CONCLUSÕES GERAIS

Neste estudo, identificamos variantes moleculares com alta associação com os mecanismos fisiopatológicos do AVC isquêmico.

- Foram identificadas variantes raras nos genes *COL4A3*, *COL6A3*, *FGFR2*, *FVIII*, *HLA-B*, previamente descritos na literatura com função relacionada à mecanismos de interesse à fisiologia do AVC isquêmico. Essas variantes são potenciais candidatas à predição do risco de ocorrência e gravidade do AVC isquêmico nos pacientes.
- Identificamos microRNAs diferencialmente expressos especificamente para cada fase do AVC isquêmico. Para a fase aguda, os microRNAs let-7, mir-182, mir-324 foram identificados e correlacionam-se com processos inflamatórios e condições de hipóxia. Para a fase crônica, o microRNA mir-34c foi identificado e associa-se com regeneração tecidual após os danos causados pelo AVC isquêmico. Observamos também, uma similaridade entre as moléculas identificadas nas análises de plasma total e associadas à EVs.
- No caso da análise metabolômica, de modo similar aos achados na análise de microRNAs, também observamos metabólitos específicos para cada fase do AVC. Na fase aguda, observamos o aumento nos níveis de piruvato, formato e GlycA e uma redução nos níveis de glutamina. Esses metabólitos associam-se com processos inflamatórios, agregamento plaquetário, metabolismo anaeróbico e aumento dos danos teciduais causados pelo processo isquêmico. Para a fase crônica, observamos um aumento nos níveis de glutamato, que pode auxiliar um aumento dos danos cerebrais e neurotoxicidade nos pacientes.
- Avaliando os achados moleculares com as fases do AVC, identificamos similaridades entre as análises, em especial, dos dados de microRNAs e metabólitos. Ambas as análises mostraram mecanismos moleculares alterados condizentes com a fisiologia do AVC, seja com a ativação e regulação de processos inflamatórios e anaeróbicos durante a fase aguda, ou com a estimulação de processos de regeneração tecidual e redução dos déficits causados pelo AVC durante a fase crônica. Com base nos dados clínicos, houve uma melhora dos déficits dos pacientes da fase aguda na evolução do AVC, simbolizando que as moléculas encontradas amenizaram os efeitos da

isquemia, apresentando efeitos benéficos aos pacientes. Contudo, os pacientes analisados na fase crônica apresentaram alta variabilidade nos déficits causados pelo AVC, o que pode explicar algumas expressões controversas, como as dos microRNAs mir-215 e mir-206 e do metabólito glutamato.

## REFERÊNCIAS

1. Caplan LR. Chapter 2 - Basic Pathology, Anatomy, and Pathophysiology of Stroke. In: Caplan LR, organizador. *Caplan's Stroke (Fourth Edition)* [Internet]. Philadelphia: W.B. Saunders; 2009 [citado 20 de abril de 2020]. p. 22–63. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416047216500043>
2. Mohr JP, Grotta JC, Wolf PA, Moskowitz MA, Mayberg MR, Kummer RV. *Stroke - Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. 5º ed. United States of America: Elsevier Saunders; 2011.
3. Markus HS. Stroke genetics: prospects for personalized medicine. *BMC Med*. 27 de setembro de 2012;10:113.
4. Adams H P, Bendixen B H, Kappelle L J, Biller J, Love B B, Gordon D L, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1º de janeiro de 1993;24(1):35–41.
5. World Health Organization. *Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016*. Geneva: World Health Organization; 2018.
6. Katan M, Luft A. Global Burden of Stroke. *Semin Neurol*. abril de 2018;38(2):208–11.
7. Kelly-Hayes M, Beiser A, Kase CS, Scaramucci A, D'Agostino RB, Wolf PA. The influence of gender and age on disability following ischemic stroke: the Framingham study. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc*. junho de 2003;12(3):119–26.
8. Sun J-H, Tan L, Yu J-T. Post-stroke cognitive impairment: epidemiology, mechanisms and management. *Ann Transl Med* [Internet]. agosto de 2014 [citado 8 de abril de 2021];2(8). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4200648/>
9. Struijs JN, van Genugten MLL, Evers SMAA, Ament AJH, Baan CA, van den Bos GAM. Future costs of stroke in the Netherlands: the impact of stroke services. *Int J Technol Assess Health Care*. 2006;22(4):518–24.
10. Johnson BH, Bonafede MM, Watson C. Short- and longer-term health-care resource utilization and costs associated with acute ischemic stroke. *Clin Outcomes Res CEOR*. 2016;8:53–61.
11. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 21 de janeiro de 2014;129(3):399–410.
12. Safanelli J, Vieira LGDR, Araujo T de, Manchope LFS, Kuhlhoff MHR, Nagel V, et al. The cost of stroke in a public hospital in Brazil: a one-year prospective study. *Arq Neuropsiquiatr*. junho de 2019;77(6):404–11.
13. Vieira LGDR, Safanelli J, Araujo T de, Schuch HA, Kuhlhoff MHR, Nagel V, et al. O custo do AVC em hospitais privados no Brasil: um estudo prospectivo. *Arq Neuropsiquiatr*. junho de 2019;77(6):393–403.
14. Demaerschalk BM, Hwang H-M, Leung G. US cost burden of ischemic stroke: a systematic literature review. *Am J Manag Care*. julho de 2010;16(7):525–33.

15. Boehme AK, Esenwa C, Elkind MSV. Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circ Res.* 3 de fevereiro de 2017;120(3):472–95.
16. Wolf PA, D’Agostino RB, Belanger AJ, Kannel WB. Probability of stroke: a risk profile from the Framingham Study. *Stroke.* março de 1991;22(3):312–8.
17. Dufouil C, Beiser A, McLure LA, Wolf PA, Tzourio C, Howard VJ, et al. A Revised Framingham Stroke Risk Profile to Reflect Temporal Trends. *Circulation.* 21 de março de 2017;135(12):1145–59.
18. Asplund Kjell, Karvanen Juha, Giampaoli Simona, Jousilahti Pekka, Niemelä Matti, Broda Grazyna, et al. Relative Risks for Stroke by Age, Sex, and Population Based on Follow-Up of 18 European Populations in the MORGAM Project. *Stroke.* 1º de julho de 2009;40(7):2319–26.
19. Kapral Moira K., Fang Jiming, Hill Michael D., Silver Frank, Richards Janice, Jaigobin Cheryl, et al. Sex Differences in Stroke Care and Outcomes. *Stroke.* 1º de abril de 2005;36(4):809–14.
20. O’Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet Lond Engl.* 10 de julho de 2010;376(9735):112–23.
21. Ekker MS, Boot EM, Singhal AB, Tan KS, Debette S, Tuladhar AM, et al. Epidemiology, aetiology, and management of ischaemic stroke in young adults. *Lancet Neurol.* 1º de setembro de 2018;17(9):790–801.
22. Guo J, Liu A, Su D. Genetics of stroke. *Acta Pharmacol Sin.* setembro de 2010;31(9):1055–64.
23. Musuka TD, Wilton SB, Traboulsi M, Hill MD. Diagnosis and management of acute ischemic stroke: speed is critical. *CMAJ Can Med Assoc J.* 8 de setembro de 2015;187(12):887–93.
24. Arboix A, Alió J. Cardioembolic Stroke: Clinical Features, Specific Cardiac Disorders and Prognosis. *Curr Cardiol Rev.* agosto de 2010;6(3):150–61.
25. Murtagh B, Smalling RW. Cardioembolic stroke. *Curr Atheroscler Rep.* 1º de julho de 2006;8(4):310–6.
26. Kamel Hooman, Healey Jeff S. Cardioembolic Stroke. *Circ Res.* 3 de fevereiro de 2017;120(3):514–26.
27. Cole JW. Large Artery Atherosclerotic Occlusive Disease. *Contin Lifelong Learn Neurol.* 3 de fevereiro de 2017;23(1):133–57.
28. Meschia JF, Bushnell C, Boden-Albala B, Braun LT, Bravata DM, Chaturvedi S, et al. Guidelines for the primary prevention of stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* dezembro de 2014;45(12):3754–832.
29. Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR, Bravata DM, Chimowitz MI, Ezekowitz MD, et al. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* julho de 2014;45(7):2160–236.

30. Spence JD. Management of Patients with an Asymptomatic Carotid Stenosis--Medical Management, Endovascular Treatment, or Carotid Endarterectomy? *Curr Neurol Neurosci Rep.* janeiro de 2016;16(1):3.
31. Østergaard L, Engedal TS, Moreton F, Hansen MB, Wardlaw JM, Dalkara T, et al. Cerebral small vessel disease: Capillary pathways to stroke and cognitive decline. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1º de fevereiro de 2016;36(2):302–25.
32. Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol.* 1º de julho de 2010;9(7):689–701.
33. Grysiewicz RA, Ruland SD. Lacunar Infarcts. In: Aminoff MJ, Daroff RB, organizadores. *Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition)* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2014 [citado 15 de dezembro de 2020]. p. 815–8. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123851574004176>
34. Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, Donnan GA, Wolf ME, Hennerici MG. The ASCOD Phenotyping of Ischemic Stroke (Updated ASCO Phenotyping). *Cerebrovasc Dis.* 2013;36(1):1–5.
35. López-Espejo M, Hernández-Chávez M, López-Espejo M, Hernández-Chávez M. Could infarct location predict the long-term functional outcome in childhood arterial ischemic stroke? *Arq Neuropsiquiatr.* outubro de 2017;75(10):692–6.
36. Laredo C, Zhao Y, Rudilosso S, Renú A, Pariente JC, Chamorro Á, et al. Prognostic Significance of Infarct Size and Location: The Case of Insular Stroke. *Sci Rep* [Internet]. 22 de junho de 2018 [citado 15 de dezembro de 2020];8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6015086/>
37. Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev.* 1º de abril de 2007;54(1):34–66.
38. González RG, Schwamm LH. Chapter 16 - Imaging acute ischemic stroke. In: Masdeu JC, González RG, organizadores. *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. Elsevier; 2016 [citado 15 de dezembro de 2020]. p. 293–315. (Neuroimaging Part I; vol. 135). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444534859000167>
39. Uzdensky AB. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro- and antiapoptotic proteins. *Apoptosis.* 1º de outubro de 2019;24(9):687–702.
40. Brott T, Adams H P, Olinger C P, Marler J R, Barsan W G, Biller J, et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke.* 1º de julho de 1989;20(7):864–70.
41. Kwah LK, Diong J. National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS). *J Physiother.* 1º de março de 2014;60(1):61.
42. Farrell B, Godwin J, Richards S, Warlow C. The United Kingdom transient ischaemic attack (UK-TIA) aspirin trial: final results. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* dezembro de 1991;54(12):1044–54.
43. Tennant A, Geddes JM, Chamberlain MA. The Barthel Index: an ordinal score or interval level measure? *Clin Rehabil.* 1º de novembro de 1996;10(4):301–8.

44. Kasner SE. Clinical interpretation and use of stroke scales. *Lancet Neurol.* julho de 2006;5(7):603–12.
45. Schlegel Daniel, Kolb Stephen J., Luciano Jean M., Tovar Jennifer M., Cucchiara Brett L., Liebeskind David S., et al. Utility of the NIH Stroke Scale as a Predictor of Hospital Disposition. *Stroke.* 1º de janeiro de 2003;34(1):134–7.
46. Rundek T, Sacco RL. Chapter 3 - Outcome following Stroke. In: Mohr JP, Choi DW, Grotta JC, Weir B, Wolf PA, organizadores. *Stroke (Fourth Edition)* [Internet]. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004 [citado 16 de dezembro de 2020]. p. 35–57. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0443066000500067>
47. Broderick JP, Adeoye O, Elm J. The Evolution of the Modified Rankin Scale and Its Use in Future Stroke Trials. *Stroke.* julho de 2017;48(7):2007–12.
48. Dewilde S, Annemans L, Peeters A, Hemelsoet D, Vandermeeren Y, Desfontaines P, et al. Modified Rankin scale as a determinant of direct medical costs after stroke. *Int J Stroke.* 1º de junho de 2017;12(4):392–400.
49. Mahoney FI, Barthel DW. Functional evaluation: The Barthel Index: A simple index of independence useful in scoring improvement in the rehabilitation of the chronically ill. *Md State Med J.* 1965;14:61–5.
50. Wade DT, Collin C. The Barthel ADL Index: A standard measure of physical disability? *Int Disabil Stud.* 1º de janeiro de 1988;10(2):64–7.
51. Quinn TJ, Langhorne P, Stott DJ. Barthel Index for Stroke Trials: Development, Properties, and Application. *Stroke.* abril de 2011;42(4):1146–51.
52. Dobkin BH, Carmichael ST. The Specific Requirements of Neural Repair Trials for Stroke. *Neurorehabil Neural Repair.* junho de 2016;30(5):470–8.
53. Hankey GJ. Stroke. *The Lancet.* fevereiro de 2017;389(10069):641–54.
54. Robinson T, Zaheer Z, Mistri AK. Thrombolysis in Acute Ischaemic Stroke: An Update. *Ther Adv Chronic Dis.* março de 2011;2(2):119–31.
55. Fugate JE, Rabinstein AA. Absolute and Relative Contraindications to IV rt-PA for Acute Ischemic Stroke. *The Neurohospitalist.* julho de 2015;5(3):110–21.
56. Molina Carlos A., Saver Jeffrey L. Extending Reperfusion Therapy for Acute Ischemic Stroke. *Stroke.* 1º de outubro de 2005;36(10):2311–20.
57. Singh P, Kaur R, Kaur A. Endovascular treatment of acute ischemic stroke. *J Neurosci Rural Pract.* 2013;4(3):298–303.
58. Caplan LR. *Stroke: A Clinical Approach.* 5º ed. Cambridge University Press; 2016.
59. Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. Vol. 24, *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology.* 2010. p. 495–509.

60. Donatti A, Canto AM, Godoi AB, da Rosa DC, Lopes-Cendes I. Circulating Metabolites as Potential Biomarkers for Neurological Disorders—Metabolites in Neurological Disorders. *Metabolites*. outubro de 2020;10(10):389.
61. Kim SJ, Moon GJ, Bang OY. Biomarkers for Stroke. *J Stroke*. janeiro de 2013;15(1):27–37.
62. Laborde CM, Mourino–Alvarez L, Akerstrom F, Padial LR, Vivanco F, Gil-Dones F, et al. Potential blood biomarkers for stroke. *Expert Rev Proteomics*. 1º de agosto de 2012;9(4):437–49.
63. Vu LT, Bowser R. Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*. janeiro de 2017;14(1):119–34.
64. Bruno DCF, Donatti A, Martin M, Almeida VS, Geraldis JC, Oliveira FS, et al. Circulating nucleic acids in the plasma and serum as potential biomarkers in neurological disorders. *Braz J Med Biol Res [Internet]*. 2020 [citado 23 de dezembro de 2020];53(10). Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0100-879X2020001000301&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0100-879X2020001000301&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
65. Koniusz S, Andrzejewska A, Muraca M, Srivastava AK, Janowski M, Lukomska B. Extracellular Vesicles in Physiology, Pathology, and Therapy of the Immune and Central Nervous System, with Focus on Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Tools. *Front Cell Neurosci [Internet]*. 2 de maio de 2016 [citado 8 de outubro de 2020];10. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4852177/>
66. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 18 de fevereiro de 2013;200(4):373–83.
67. Battistelli M, Falcieri E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology [Internet]*. 20 de janeiro de 2020 [citado 9 de outubro de 2020];9(1). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7168913/>
68. Chen Y, Li G, Liu M-L. Microvesicles as Emerging Biomarkers and Therapeutic Targets in Cardiometabolic Diseases. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 1º de fevereiro de 2018;16(1):50–62.
69. Edgar JR. Q&A: What are exosomes, exactly? *BMC Biol*. 13 de junho de 2016;14(1):46.
70. Harding C, Heuser J, Stahl P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol*. novembro de 1984;35(2):256–63.
71. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*. setembro de 1985;101(3):942–8.
72. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci*. 15 de fevereiro de 2019;9(1):19.
73. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. agosto de 2002;2(8):569–79.

74. Ghoreishy A, Khosravi A, Ghaemmaghami A. Exosomal microRNA and stroke: A review. *J Cell Biochem.* 2019;120(10):16352–61.
75. Lopez JP, Diallo A, Cruceanu C, Fiori LM, Laboissiere S, Guillet I, et al. Biomarker discovery: quantification of microRNAs and other small non-coding RNAs using next generation sequencing. *BMC Med Genomics.* 1º de julho de 2015;8:35.
76. Zhang P, Wu W, Chen Q, Chen M. Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *J Integr Bioinforma* [Internet]. 13 de julho de 2019 [citado 8 de outubro de 2020];16(3). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6798851/>
77. Cappelletti V, Appierto V, Tiberio P, Fina E, Callari M, Daidone MG. Circulating Biomarkers for Prediction of Treatment Response. *J Natl Cancer Inst Monogr.* maio de 2015;2015(51):60–3.
78. de Rie D, Abugessaisa I, Alam T, Arner E, Arner P, Ashoor H, et al. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat Biotechnol.* setembro de 2017;35(9):872–8.
79. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol* [Internet]. 2018 [citado 15 de maio de 2020];9. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00402/full>
80. Ipsaro JJ, Joshua-Tor L. From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat Struct Mol Biol.* janeiro de 2015;22(1):20–8.
81. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet.* fevereiro de 2011;12(2):99–110.
82. Dharap A, Pokrzywa C, Murali S, Pandi G, Vemuganti R. MicroRNA miR-324-3p Induces Promoter-Mediated Expression of RelA Gene. *PLOS ONE.* 12 de novembro de 2013;8(11):e79467.
83. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* abril de 2011;13(4):423–33.
84. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci.* 22 de março de 2011;108(12):5003–8.
85. Liu P, Li R, Antonov AA, Wang L, Li W, Hua Y, et al. Discovery of Metabolite Biomarkers for Acute Ischemic Stroke Progression. *J Proteome Res.* 3 de fevereiro de 2017;16(2):773–9.
86. Wang D, Kong J, Wu J, Wang X, Lai M. GC–MS-based metabolomics identifies an amino acid signature of acute ischemic stroke. *Neurosci Lett.* 6 de março de 2017;642:7–13.
87. Lindgren A. Stroke genetics: a review and update. *J Stroke.* setembro de 2014;16(3):114–23.
88. Stewart JC, Cramer SC. Genetic Variation and Neuroplasticity: Role in Rehabilitation After Stroke. *J Neurol Phys Ther JNPT.* 2017;41 Suppl 3:S17–23.
89. Meschia JF, Worrall BB, Rich SS. Genetic susceptibility to ischemic stroke. *Nat Rev Neurol.* 31 de maio de 2011;7(7):369–78.

90. Griessenauer CJ, Farrell S, Sarkar A, Zand R, Abedi V, Holland N, et al. Genetic susceptibility to cerebrovascular disease: A systematic review. *J Cereb Blood Flow Metab.* novembro de 2018;38(11):1853–71.
91. Schiffmann R. Fabry disease. *Handb Clin Neurol.* 2015;132:231–48.
92. Wang MM. CADASIL. *Handb Clin Neurol.* 2018;148:733–43.
93. Fujimura M, Bang OY, Kim JS. Moyamoya Disease. *Front Neurol Neurosci.* 2016;40:204–20.
94. Tikka S, Baumann M, Siitonen M, Pasanen P, Pöyhönen M, Myllykangas L, et al. CADASIL and CARASIL. *Brain Pathol Zurich Switz.* setembro de 2014;24(5):525–44.
95. He W, Lu M, Li G, Sun Z, Liu D, Gu L. Methylene Tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) rs868014 Polymorphism Regulated by miR-1203 Associates with Risk and Short Term Outcome of Ischemic Stroke. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2017;41(2):701–10.
96. Wei LK, Au A, Menon S, Griffiths LR, Kooi CW, Irene L, et al. Polymorphisms of MTHFR, eNOS, ACE, AGT, ApoE, PON1, PDE4D, and Ischemic Stroke: Meta-Analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc.* novembro de 2017;26(11):2482–93.
97. Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 4 de abril de 2006;113(13):1708–14.
98. Yamada Y, Sakuma J, Takeuchi I, Yasukochi Y, Kato K, Oguri M, et al. Identification of six polymorphisms as novel susceptibility loci for ischemic or hemorrhagic stroke by exome-wide association studies. *Int J Mol Med.* junho de 2017;39(6):1477–91.
99. Rees DC. The population genetics of factor V Leiden (Arg506Gln). *Br J Haematol.* dezembro de 1996;95(4):579–86.
100. Malik R, Dau T, Gonik M, Sivakumar A, Deredge DJ, Edeleva EV, et al. Common coding variant in SERPINA1 increases the risk for large artery stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 de abril de 2017;114(14):3613–8.
101. Sun L, Tian L, Xu J, Zhang Z, Liu X. Chromosome 4q25 Variants and Age at Onset of Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol.* julho de 2017;54(5):3388–94.
102. Pan Y, Chen W, Xu Y, Yi X, Han Y, Yang Q, et al. Genetic Polymorphisms and Clopidogrel Efficacy for Acute Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation.* 3 de janeiro de 2017;135(1):21–33.
103. Tomek A, Mat’oška V, Frýdmanová A, Magerová H, Šrámek M, Paulasova-Schwabová J, et al. Impact of CYP2C19 Polymorphisms on Clinical Outcomes and Antiplatelet Potency of Clopidogrel in Caucasian Poststroke Survivors. *Am J Ther.* abril de 2018;25(2):e202–12.
104. Yi X, Lin J, Wang Y, Zhou Q, Wang C, Cheng W, et al. Association of Cytochrome P450 Genetic Variants with Clopidogrel Resistance and Outcomes in Acute Ischemic Stroke. *J Atheroscler Thromb.* 1º de outubro de 2016;23(10):1188–200.

105. Wang Y, Zhao X, Lin J, Li H, Johnston SC, Lin Y, et al. Association Between CYP2C19 Loss-of-Function Allele Status and Efficacy of Clopidogrel for Risk Reduction Among Patients With Minor Stroke or Transient Ischemic Attack. *JAMA*. 5 de julho de 2016;316(1):70–8.
106. Génin E. Missing heritability of complex diseases: case solved? *Hum Genet*. janeiro de 2020;139(1):103–13.
107. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. outubro de 2009;461(7265):747–53.
108. Muller L, Hong C-S, Stolz DB, Watkins SC, Whiteside TL. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *J Immunol Methods*. setembro de 2014;411:55–65.
109. Rodrigues-Junior DM, Tan SS, Lim SK, Leong HS, Melendez ME, Ramos CRN, et al. Circulating extracellular vesicle-associated TGF $\beta$ 3 modulates response to cytotoxic therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 31 de dezembro de 2019;40(12):1452–61.
110. Sakaue T, Koga H, Iwamoto H, Nakamura T, Ikezono Y, Abe M, et al. Glycosylation of ascites-derived exosomal CD133: a potential prognostic biomarker in patients with advanced pancreatic cancer. *Med Mol Morphol*. dezembro de 2019;52(4):198–208.
111. Tzoran I, Rebibo-Sabbah A, Brenner B, Aharon A. Disease dynamics in patients with acute myeloid leukemia: new biomarkers. *Exp Hematol*. novembro de 2015;43(11):936–43.
112. Castelli V, Antonucci I, d'Angelo M, Tessitore A, Zelli V, Benedetti E, et al. Neuroprotective effects of human amniotic fluid stem cells-derived secretome in an ischemia/reperfusion model. *Stem Cells Transl Med*. 7 de outubro de 2020;
113. Duan S, Wang F, Cao J, Wang C. Exosomes Derived from MicroRNA-146a-5p-Enriched Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Alleviate Intracerebral Hemorrhage by Inhibiting Neuronal Apoptosis and Microglial M1 Polarization. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:3143–58.
114. Jiang Y, He R, Shi Y, Liang J, Zhao L. Plasma exosomes protect against cerebral ischemia/reperfusion injury via exosomal HSP70 mediated suppression of ROS. *Life Sci*. 1º de setembro de 2020;256:117987.
115. Yang J, Wu S, Hou L, Zhu D, Yin S, Yang G, et al. Therapeutic Effects of Simultaneous Delivery of Nerve Growth Factor mRNA and Protein via Exosomes on Cerebral Ischemia. *Mol Ther Nucleic Acids*. 4 de setembro de 2020;21:512–22.
116. Couch Y, Akbar N, Davis S, Fischer R, Dickens AM, Neuhaus AA, et al. Inflammatory Stroke Extracellular Vesicles Induce Macrophage Activation. *Stroke*. 2017;48(8):2292–6.
117. Lee JY, Kim E, Choi S-M, Kim D-W, Kim KP, Lee I, et al. Microvesicles from brain-extract-treated mesenchymal stem cells improve neurological functions in a rat model of ischemic stroke. *Sci Rep*. 09 de 2016;6:33038.
118. Xin H, Li Y, Buller B, Katakowski M, Zhang Y, Wang X, et al. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem Cells Dayt Ohio*. julho de 2012;30(7):1556–64.
119. Zhang G, Chen L, Guo X, Wang H, Chen W, Wu G, et al. Comparative Analysis of microRNA Expression Profiles of Exosomes Derived from Normal and Hypoxic Preconditioning Human

- Neural Stem Cells by Next Generation Sequencing. *J Biomed Nanotechnol.* 1º de junho de 2018;14(6):1075–89.
120. Li D-B, Liu J-L, Wang W, Li R-Y, Yu D-J, Lan X-Y, et al. Plasma Exosomal miR-422a and miR-125b-2-3p Serve as Biomarkers for Ischemic Stroke. *Curr Neurovasc Res.* 2017;14(4):330–7.
  121. Wang W, Li D-B, Li R-Y, Zhou X, Yu D-J, Lan X-Y, et al. Diagnosis of Hyperacute and Acute Ischaemic Stroke: The Potential Utility of Exosomal MicroRNA-21-5p and MicroRNA-30a-5p. *Cerebrovasc Dis Basel Switz.* 2018;45(5–6):204–12.
  122. Zhou J, Chen L, Chen B, Huang S, Zeng C, Wu H, et al. Increased serum exosomal miR-134 expression in the acute ischemic stroke patients. *BMC Neurol.* 4 de dezembro de 2018;18(1):198.
  123. Long G, Wang F, Li H, Yin Z, Sandip C, Lou Y, et al. Circulating miR-30a, miR-126 and let-7b as biomarker for ischemic stroke in humans. *BMC Neurol.* 16 de novembro de 2013;13:178.
  124. Jickling GC, Ander BP, Zhan X, Noblett D, Stamova B, Liu D. microRNA expression in peripheral blood cells following acute ischemic stroke and their predicted gene targets. *PLoS One.* 2014;9(6):e99283.
  125. He X-W, Shi Y-H, Liu Y-S, Li G-F, Zhao R, Hu Y, et al. Increased plasma levels of miR-124-3p, miR-125b-5p and miR-192-5p are associated with outcomes in acute ischaemic stroke patients receiving thrombolysis. *Atherosclerosis.* 1º de outubro de 2019;289:36–43.
  126. Xiang W, Tian C, Lin J, Wu X, Pang G, Zhou L, et al. Plasma let-7i and miR-15a expression are associated with the effect of recombinant tissue plasminogen activator treatment in acute ischemic stroke patients. *Thromb Res.* 1º de outubro de 2017;158:121–5.
  127. Lv B, Cheng X, Sharp FR, Ander BP, Liu DZ. MicroRNA-122 Mimic Improves Stroke Outcomes and Indirectly Inhibits NOS2 After Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Front Neurosci.* 2018;12:767.
  128. Maas MB, Furie KL. Molecular biomarkers in stroke diagnosis and prognosis. *Biomark Med.* 1º de agosto de 2009;3(4):363–83.
  129. Mamas M, Dunn WB, Neyses L, Goodacre R. The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Arch Toxicol.* 1º de janeiro de 2011;85(1):5–17.
  130. Ellis DI, Dunn WB, Griffin JL, Allwood JW, Goodacre R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics.* setembro de 2007;8(9):1243–66.
  131. Lee T-H, Cheng M-L, Shiao M-S, Lin C-N. Metabolomics study in severe extracranial carotid artery stenosis. *BMC Neurol* [Internet]. 24 de junho de 2019 [citado 3 de outubro de 2019];19. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6589885/>
  132. Sidorov E, Sanghera DK, Vanamala JKP. Biomarker for Ischemic Stroke Using Metabolome: A Clinician Perspective. *J Stroke.* 31 de janeiro de 2019;21(1):31–41.
  133. Mamatha SN, Nagaraja D, Philip M, Christopher R. Asymmetric dimethylarginine as a risk marker for early-onset ischemic stroke in Indian population. *Clin Chim Acta.* 14 de janeiro de 2011;412(1):139–42.

134. Kimberly WT, Wang Y, Pham L, Furie KL, Gerszten RE. Metabolite Profiling Identifies a Branched Chain Amino Acid Signature in Acute Cardioembolic Stroke. *Stroke J Cereb Circ* [Internet]. maio de 2013 [citado 23 de setembro de 2019];44(5). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3816089/>
135. Lee Y, Khan A, Hong S, Jee SH, Park YH. A metabolomic study on high-risk stroke patients determines low levels of serum lysine metabolites: a retrospective cohort study. *Mol Biosyst*. 30 de maio de 2017;13(6):1109–20.
136. Pilz Stefan, Tomaschitz Andreas, Meinitzer Andreas, Drechsler Christiane, Ritz Eberhard, Krane Vera, et al. Low Serum Homocysteine Is a Novel Risk Factor for Fatal Strokes in Patients Undergoing Coronary Angiography. *Stroke*. 1º de abril de 2011;42(4):1132–4.
137. Jung Jee Youn, Lee Ho-Sub, Kang Dae-Gill, Kim No Soo, Cha Min Ho, Bang Ok-Sun, et al. 1H-NMR-Based Metabolomics Study of Cerebral Infarction. *Stroke*. 1º de maio de 2011;42(5):1282–8.
138. Jové M, Mauri-Capdevila G, Suárez I, Cambray S, Sanahuja J, Quílez A, et al. Metabolomics predicts stroke recurrence after transient ischemic attack. *Neurology*. 6 de janeiro de 2015;84(1):36–45.
139. Crowther LM, Poms M, Plecko B. Multiomics tools for the diagnosis and treatment of rare neurological disease. *J Inher Metab Dis*. 2018;41(3):425–34.
140. Xu G, Li J. Recent advances in mass spectrometry imaging for multiomics application in neurology. *J Comp Neurol*. 2019;527(13):2158–69.
141. Sancesario GM, Bernardini S. Alzheimer’s disease in the omics era. *Clin Biochem*. 1º de setembro de 2018;59:9–16.
142. Jiang T, Tan M-S, Tan L, Yu J-T. Application of next-generation sequencing technologies in Neurology. *Ann Transl Med*. dezembro de 2014;2(12):125.
143. Cirulli ET, Singh A, Shianna KV, Ge D, Smith JP, Maia JM, et al. Screening the human exome: a comparison of whole genome and whole transcriptome sequencing. *Genome Biol*. 2010;11(5):R57.
144. Auer PL, Lettre G. Rare variant association studies: considerations, challenges and opportunities. *Genome Med*. 2015;7(1):16.
145. Warman Chardon J, Beaulieu C, Hartley T, Boycott KM, Dymont DA. Axons to Exons: the Molecular Diagnosis of Rare Neurological Diseases by Next-Generation Sequencing. *Curr Neurol Neurosci Rep*. setembro de 2015;15(9):64.
146. Gamazon ER, Stranger BE. Genomics of alternative splicing: evolution, development and pathophysiology. *Hum Genet*. junho de 2014;133(6):679–87.
147. Clark MJ, Chen R, Lam HYK, Karczewski KJ, Chen R, Euskirchen G, et al. Performance comparison of exome DNA sequencing technologies. *Nat Biotechnol*. 25 de setembro de 2011;29(10):908–14.
148. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. janeiro de 2009;10(1):57–63.

149. Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res.* setembro de 2008;18(9):1509–17.
150. Sharp FR, Jickling GC, Stamova B, Tian Y, Zhan X, Liu D, et al. Molecular markers and mechanisms of stroke: RNA studies of blood in animals and humans. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* julho de 2011;31(7):1513–31.
151. Hagemann-Jensen M, Abdullayev I, Sandberg R, Faridani OR. Small-seq for single-cell small-RNA sequencing. *Nat Protoc.* outubro de 2018;13(10):2407–24.
152. Pantaleão LC, Ozanne SE. Small RNA Sequencing: A Technique for miRNA Profiling. *Investig Early Nutr Eff Long-Term Health.* 2018;321–30.
153. Puchades-Carrasco L, Pineda-Lucena A. Metabolomics in pharmaceutical research and development. *Curr Opin Biotechnol.* 1º de dezembro de 2015;35:73–7.
154. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. “Metabonomics”: Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica.* 1999;29(11):1181–9.
155. Duarte IF, Diaz SO, Gil AM. NMR metabolomics of human blood and urine in disease research. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;93:17–26.
156. Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. Vol. 2, *Comparative and Functional Genomics. Comp Funct Genomics*; 2001. p. 155–68.
157. Klassen A, Faccio AT, Canuto GAB, da Cruz PLR, Ribeiro HC, Tavares MFM, et al. Metabolomics: Definitions and significance in systems biology. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer New York LLC; 2017. p. 3–17.
158. Constantino MG. *Química Orgânica - Curso Básico Universitário - Vol. 3.* 1º ed. Livros Técnicos e Científicos LTC; 2008. 133–169 p.
159. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. *Introdução à Espectroscopia.* 4º ed. São Paulo: Cengage Learning; 2010.
160. Heude C, Nath J, Carrigan JB, Ludwig C. Nuclear magnetic resonance strategies for metabolic analysis. In: Sussulini A, organizador. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer New York LLC; 2017. p. 45–76.
161. Sethi S, Hayashi MAF, Barbosa BS, Pontes JGM, Tasic L, Brietzke E. Lipidomics, biomarkers, and schizophrenia: A current perspective. In: Sussulini A, organizador. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer New York LLC; 2017. p. 265–90.
162. Emwas A-H, Roy R, McKay RT, Tenori L, Saccenti E, Gowda GAN, et al. NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites* [Internet]. 27 de junho de 2019 [citado 14 de janeiro de 2021];9(7). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6680826/>
163. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 3º ed. Vol. 1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 2001.

164. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet.* maio de 2011;43(5):491–8.
165. Auwera GAV der, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Angel G del, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ Data to High-Confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices Pipeline. *Curr Protoc Bioinforma.* 2013;43(1):11.10.1-11.10.33.
166. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma Oxf Engl.* 15 de julho de 2009;25(14):1754–60.
167. Calling variants on cohorts of samples using the HaplotypeCaller in GVCF mode [Internet]. GATK. [citado 18 de novembro de 2020]. Disponível em: <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360035890411-Calling-variants-on-cohorts-of-samples-using-the-HaplotypeCaller-in-GVCF-mode>
168. Rocha CS, Secolin R, Rodrigues MR, Carvalho BS, Lopes-Cendes I. The Brazilian Initiative on Precision Medicine (BIPMed): fostering genomic data-sharing of underrepresented populations. *NPJ Genomic Med.* 2020;5:42.
169. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res.* 1º de janeiro de 2014;42(Database issue):D980.
170. Valles GJ, Bezsonova I, Woodgate R, Ashton NW. USP7 Is a Master Regulator of Genome Stability. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:717.
171. Fountain MD, Oleson DS, Rech ME, Segebrecht L, Hunter JV, McCarthy JM, et al. Pathogenic variants in USP7 cause a neurodevelopmental disorder with speech delays, altered behavior, and neurologic anomalies. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* agosto de 2019;21(8):1797–807.
172. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Pecoraro R, Casuccio A, Di Bona D, Aiello A, et al. HLA and killer cell immunoglobulin-like receptor (KIRs) genotyping in patients with acute ischemic stroke. *J Neuroinflammation.* 17 de abril de 2019;16(1):88.
173. Murali V, Rathika C, Ramgopal S, Malini RP, Kumar MJA, Arasu VN, et al. Susceptible and protective associations of HLA DRB1\*/DQB1\* alleles and haplotypes with ischaemic stroke. *Int J Immunogenet.* 2016;43(3):159–65.
174. Styles LA, Hoppe C, Klitz W, Vichinsky E, Lubin B, Trachtenberg E. Evidence for HLA-related susceptibility for stroke in children with sickle cell disease. *Blood.* 1º de junho de 2000;95(11):3562–7.
175. Zou L-P, Guo Y-H, Fang F, Jin H, Wu H-S, Mix E. Evidence for Human Leukocyte Antigen-Related Susceptibility in Idiopathic Childhood Ischemic Stroke. *Eur Neurol.* 2002;48(3):153–7.
176. Sayad A, Akbari MT, Inoko H, Khazaei M, Mehdizadeh B, Taheri M, et al. Association between human leucocyte antigen alleles and risk of stroke in Iranian population. *Int J Immunogenet.* junho de 2019;46(3):179–91.
177. Traenka C, Kloss M, Strom T, Lyrer P, Brandt T, Bonati LH, et al. Rare genetic variants in patients with cervical artery dissection. *Eur Stroke J.* dezembro de 2019;4(4):355–62.

178. Edwards DN, Bix GJ. Roles of blood-brain barrier integrins and extracellular matrix in stroke. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 21 de novembro de 2018;316(2):C252–63.
179. Härtig W, Mages B, Aleithe S, Nitzsche B, Altmann S, Barthel H, et al. Damaged Neocortical Perineuronal Nets Due to Experimental Focal Cerebral Ischemia in Mice, Rats and Sheep. *Front Integr Neurosci*. 2017;11:15.
180. Hamann GF, Liebetrau M, Martens H, Burggraf D, Kloss CUA, Bültemeier G, et al. Microvascular basal lamina injury after experimental focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. maio de 2002;22(5):526–33.
181. De Meyer SF, Denorme F, Langhauser F, Geuss E, Fluri F, Kleinschnitz C. Thromboinflammation in Stroke Brain Damage. *Stroke*. abril de 2016;47(4):1165–72.
182. Harima K, Honda S, Mikami K, Kitajima M, Urushizaka M, Tomisawa T, et al. Collagen-Induced Platelet Aggregates, Diabetes, and Aspirin Therapy Predict Clinical Outcomes in Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc*. agosto de 2019;28(8):2302–10.
183. Liang C, Zhang J, Liu H, Ma J, An Z, Xia W, et al. Association of COL4A2 Gene Polymorphisms with Lacunar Stroke in Xinjiang Han Populations. *J Mol Neurosci MN*. setembro de 2019;69(1):133–9.
184. Armstrong RA. What causes alzheimer’s disease? *Folia Neuropathol*. 2013;51(3):169–88.
185. Selkoe DJ. Alzheimer’s disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. abril de 2001;81(2):741–66.
186. Pottier C, Wallon D, Lecrux AR, Maltete D, Bombois S, Jurici S, et al. Amyloid- $\beta$  protein precursor gene expression in alzheimer’s disease and other conditions. *J Alzheimers Dis JAD*. 2012;28(3):561–6.
187. Hefter D, Draguhn A. APP as a Protective Factor in Acute Neuronal Insults. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2 de fevereiro de 2017 [citado 13 de abril de 2021];10. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5288400/>
188. Brunholz S, Sisodia S, Lorenzo A, Deyts C, Kins S, Morfini G. Axonal transport of APP and the spatial regulation of APP cleavage and function in neuronal cells. *Exp Brain Res*. abril de 2012;217(3–4):353–64.
189. Zhao J, O’Connor T, Vassar R. The contribution of activated astrocytes to A $\beta$  production: implications for Alzheimer’s disease pathogenesis. *J Neuroinflammation*. 2 de novembro de 2011;8:150.
190. Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic BV. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell*. 19 de novembro de 2015;163(5):1064–78.
191. Yang X, Sheng W, Ridgley DM, Haidekker MA, Sun GY, Lee JC. Astrocytes regulate  $\alpha$ -secretase-cleaved soluble amyloid precursor protein secretion in neuronal cells: Involvement of group IIA secretory phospholipase A2. *Neuroscience*. 6 de agosto de 2015;300:508–17.

192. Thiel A, Cechetto DF, Heiss W-D, Hachinski V, Whitehead SN. Amyloid burden, neuroinflammation, and links to cognitive decline after ischemic stroke. *Stroke*. setembro de 2014;45(9):2825–9.
193. Sotomayor-Sobrino MA, Ochoa-Aguilar A, Méndez-Cuesta LA, Gómez-Acevedo C. Neuroimmunological interactions in stroke. *Neurol Barc Spain*. junho de 2019;34(5):326–35.
194. Wanve M, Kaur H, Sarmah D, Saraf J, Pravalika K, Vats K, et al. Therapeutic spectrum of interferon- $\beta$  in ischemic stroke. *J Neurosci Res*. fevereiro de 2019;97(2):116–27.
195. Arumugam TV, Baik S-H, Balaganapathy P, Sobey CG, Mattson MP, Jo D-G. Notch signaling and neuronal death in stroke. *Prog Neurobiol*. agosto de 2018;165–167:103–16.
196. Hack RJ, Rutten JW, Person TN, Li J, Khan A, Griessenauer CJ, et al. Cysteine-Altering NOTCH3 Variants Are a Risk Factor for Stroke in the Elderly Population. *Stroke*. dezembro de 2020;51(12):3562–9.
197. Lee Y-C, Chung C-P, Chang M-H, Wang S-J, Liao Y-C. NOTCH3 cysteine-altering variant is an important risk factor for stroke in the Taiwanese population. *Neurology*. 7 de janeiro de 2020;94(1):e87–96.
198. House SL, Castro AM, Lupu TS, Weinheimer C, Smith C, Kovacs A, et al. Endothelial fibroblast growth factor receptor signaling is required for vascular remodeling following cardiac ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1º de março de 2016;310(5):H559-571.
199. Cohen RI, Chandross KJ. Fibroblast growth factor-9 modulates the expression of myelin related proteins and multiple fibroblast growth factor receptors in developing oligodendrocytes. *J Neurosci Res*. 1º de agosto de 2000;61(3):273–87.
200. Rohmann JL, Huo S, Sperber PS, Piper SK, Rosendaal FR, Heuschmann PU, et al. Coagulation factor XII, XI, and VIII activity levels and secondary events after first ischemic stroke. *J Thromb Haemost JTH*. dezembro de 2020;18(12):3316–24.
201. Kuo C-Y, Lin C-H, Kuo Y-W, Huang Y-C, Hsu H-L, Lin Y-H, et al. Factor VIII levels are associated with ischemic stroke, stroke subtypes and neurological worsening. *Curr Neurovasc Res*. 2015;12(1):85–90.
202. Liu Z, Li Y, Qian J, Cui Y, Chopp M. Plasminogen deficiency causes reduced corticospinal axonal plasticity and functional recovery after stroke in mice. *PloS One*. 2014;9(4):e94505.
203. Nicholl SM, Roztocil E, Davies MG. Plasminogen activator system and vascular disease. *Curr Vasc Pharmacol*. abril de 2006;4(2):101–16.
204. Draxler DF, Lee F, Ho H, Keragala CB, Medcalf RL, Niogo B. t-PA Suppresses the Immune Response and Aggravates Neurological Deficit in a Murine Model of Ischemic Stroke. *Front Immunol*. 2019;10:591.
205. Cheyuo C, Aziz M, Yang W-L, Jacob A, Zhou M, Wang P. Milk fat globule-EGF factor VIII attenuates CNS injury by promoting neural stem cell proliferation and migration after cerebral ischemia. *PloS One*. 2015;10(4):e0122833.

206. Qin C, Zhou L-Q, Ma X-T, Hu Z-W, Yang S, Chen M, et al. Dual Functions of Microglia in Ischemic Stroke. *Neurosci Bull.* outubro de 2019;35(5):921–33.
207. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* junho de 2015;4(3):215–66.
208. Malik R, Traylor M, Pulit SL, Bevan S, Hopewell JC, Holliday EG, et al. Low-frequency and common genetic variation in ischemic stroke. *Neurology.* 29 de março de 2016;86(13):1217–26.
209. Page K, Guttery DS, Zahra N, Primrose L, Elshaw SR, Pringle JH, et al. Influence of Plasma Processing on Recovery and Analysis of Circulating Nucleic Acids. *PLOS ONE.* 18 de outubro de 2013;8(10):e77963.
210. Shah JS, Soon PS, Marsh DJ. Comparison of Methodologies to Detect Low Levels of Hemolysis in Serum for Accurate Assessment of Serum microRNAs. *PLOS ONE.* 7 de abril de 2016;11(4):e0153200.
211. Unger J, Filippi G, Patsch W. Measurements of Free Hemoglobin and Hemolysis Index: EDTA- or Lithium-Heparinate Plasma? *Clin Chem.* 1º de setembro de 2007;53(9):1717–8.
212. Heireman L, Van Geel P, Musger L, Heylen E, Uyttenbroeck W, Mahieu B. Causes, consequences and management of sample hemolysis in the clinical laboratory. *Clin Biochem.* dezembro de 2017;50(18):1317–22.
213. Koseoglu M, Hur A, Atay A, Cuhadar S. Effects of hemolysis interference on routine biochemistry parameters. *Biochem Medica.* 15 de fevereiro de 2011;21(1):79–85.
214. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinforma Oxf Engl.* 1º de abril de 2014;30(7):923–30.
215. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 1º de janeiro de 2006;34(suppl\_1):D140–4.
216. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 1º de janeiro de 2008;36(suppl\_1):D154–8.
217. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 1º de janeiro de 2011;39(suppl\_1):D152–7.
218. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 8 de janeiro de 2019;47(D1):D155–62.
219. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing [Internet]. 2020; Disponível em: <https://www.R-project.org/>
220. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 5 de dezembro de 2014;15(12):550.
221. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol.* 1995;57(1):289–300.

222. Chang L, Zhou G, Soufan O, Xia J. miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. *Nucleic Acids Res.* 2 de julho de 2020;48(W1):W244–51.
223. Peng G, Yuan Y, Wu S, He F, Hu Y, Luo B. MicroRNA let-7e Is a Potential Circulating Biomarker of Acute Stage Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res.* 1º de dezembro de 2015;6(6):437–45.
224. Hulsmans M, Holvoet P. MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease. *Cardiovasc Res.* 1º de outubro de 2013;100(1):7–18.
225. Bernstein DL, Gajghate S, Reichenbach NL, Winfield M, Persidsky Y, Heldt NA, et al. let-7g counteracts endothelial dysfunction and ameliorating neurological functions in mouse ischemia/reperfusion stroke model. *Brain Behav Immun.* 1º de julho de 2020;87:543–55.
226. Cho KJ, Song J, Oh Y, Lee JE. MicroRNA-Let-7a regulates the function of microglia in inflammation. *Mol Cell Neurosci.* setembro de 2015;68:167–76.
227. Sun H, Zhong D, Jin J, Liu Q, Wang H, Li G. Upregulation of miR-215 exerts neuroprotection effects against ischemic injury via negative regulation of Act1/IL-17RA signaling. *Neurosci Lett.* 1º de janeiro de 2018;662:233–41.
228. Wang J, Xu Z, Chen X, Li Y, Chen C, Wang C, et al. MicroRNA-182-5p attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by targeting Toll-like receptor 4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2 de novembro de 2018;505(3):677–84.
229. Lee ST, Chu K, Jung KH, Yoon HJ, Jeon D, Kang KM, et al. MicroRNAs induced during ischemic preconditioning. *Stroke.* agosto de 2010;41(8):1646–51.
230. Panigrahi GK, Ramteke A, Birks D, Abouzeid Ali HE, Venkataraman S, Agarwal C, et al. Exosomal microRNA profiling to identify hypoxia-related biomarkers in prostate cancer. *Oncotarget.* 17 de fevereiro de 2018;9(17):13894–910.
231. Xu X, Kim JJ, Li Y, Xie J, Shao C, Wei J-J. Oxidative stress-induced miRNAs modulate AKT signaling and promote cellular senescence in uterine leiomyoma. *J Mol Med Berl Ger.* 2018;96(10):1095–106.
232. Yan D, Dong XD, Chen X, Yao S, Wang L, Wang J, et al. Role of microRNA-182 in posterior uveal melanoma: regulation of tumor development through MITF, BCL2 and cyclin D2. *PloS One.* 2012;7(7):e40967.
233. Chai Y, Xie M. LINC01579 promotes cell proliferation by acting as a ceRNA of miR-139-5p to upregulate EIF4G2 expression in glioblastoma. *J Cell Physiol.* 2019;234(12):23658–66.
234. Yang Y, Fan X, Mao M, Song X, Wu P, Zhang Y, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine. *Cell Res.* maio de 2017;27(5):626–41.
235. Kerever A, Mercier F, Nonaka R, de Vega S, Oda Y, Zalc B, et al. Perlecan is required for FGF-2 signaling in the neural stem cell niche. *Stem Cell Res.* março de 2014;12(2):492–505.
236. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors Chur Switz.* setembro de 2004;22(3):123–31.

237. Mang CS, Campbell KL, Ross CJD, Boyd LA. Promoting neuroplasticity for motor rehabilitation after stroke: considering the effects of aerobic exercise and genetic variation on brain-derived neurotrophic factor. *Phys Ther.* dezembro de 2013;93(12):1707–16.
238. Balkaya M, Cho S. Genetics of stroke recovery: BDNF val66met polymorphism in stroke recovery and its interaction with aging. *Neurobiol Dis.* 2019;126:36–46.
239. Sohrabji F. Estrogen-IGF-1 interactions in neuroprotection: ischemic stroke as a case study. *Front Neuroendocrinol.* janeiro de 2015;36:1–14.
240. Feng S-J, Zhang X-Q, Li J-T, Dai X-M, Zhao F. miRNA-223 regulates ischemic neuronal injury by targeting the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R). *Folia Neuropathol.* 2018;56(1):49–57.
241. Zhang J, Liu M, Huang M, Chen M, Zhang D, Luo L, et al. Ginsenoside F1 promotes angiogenesis by activating the IGF-1/IGF1R pathway. *Pharmacol Res.* 2019;144:292–305.
242. Lee H-T, Chang H-T, Lee S, Lin C-H, Fan J-R, Lin S-Z, et al. Role of IGF1R(+) MSCs in modulating neuroplasticity via CXCR4 cross-interaction. *Sci Rep.* 02 de 2016;6:32595.
243. Liu X, Li J, Li X. miR-142-5p regulates the progression of diabetic retinopathy by targeting IGF1. *Int J Immunopathol Pharmacol.* dezembro de 2020;34:2058738420909041.
244. Chen L, Wang Q, Wang G, Wang H, Huang Y, Liu X, et al. miR-16 inhibits cell proliferation by targeting IGF1R and the Raf1-MEK1/2-ERK1/2 pathway in osteosarcoma. *FEBS Lett.* 2 de maio de 2013;587(9):1366–72.
245. Tesfay L, Schulz VV, Frank SB, Lamb LE, Miranti CK. Receptor tyrosine kinase Met promotes cell survival via kinase-independent maintenance of integrin  $\alpha 3\beta 1$ . *Mol Biol Cell.* 01 de 2016;27(15):2493–504.
246. Du Z, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer.* 19 de 2018;17(1):58.
247. Yamaguchi J, Suzuki C, Nanao T, Kakuta S, Ozawa K, Tanida I, et al. Atg9a deficiency causes axon-specific lesions including neuronal circuit dysgenesis. *Autophagy.* 2018;14(5):764–77.
248. De Pace R, Skirzewski M, Damme M, Mattera R, Mercurio J, Foster AM, et al. Altered distribution of ATG9A and accumulation of axonal aggregates in neurons from a mouse model of AP-4 deficiency syndrome. *PLoS Genet.* 2018;14(4):e1007363.
249. Zhang D-L, Liu X, Wang Q, Li N, Wu S-H, Wang C. Downregulation of microRNA-196a attenuates ischemic brain injury in rats by directly targeting HMGA1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* janeiro de 2019;23(2):740–8.
250. Kong B, Qin Z, Ye Z, Yang X, Li L, Su Q. microRNA-26a-5p affects myocardial injury induced by coronary microembolization by modulating HMGA1. *J Cell Biochem.* 2019;120(6):10756–66.
251. Li D, Jia H, Zhang H, Lv M, Liu J, Zhang Y, et al. TLR4 signaling induces the release of microparticles by tumor cells that regulate inflammatory cytokine IL-6 of macrophages via microRNA let-7b. *Oncoimmunology.* 1º de agosto de 2012;1(5):687–93.

252. Ni J, Wang X, Chen S, Liu H, Wang Y, Xu X, et al. MicroRNA let-7c-5p protects against cerebral ischemia injury via mechanisms involving the inhibition of microglia activation. *Brain Behav Immun*. outubro de 2015;49:75–85.
253. Selvamani A, Sathyan P, Miranda RC, Sohrabji F. An Antagomir to MicroRNA Let7f Promotes Neuroprotection in an Ischemic Stroke Model. *PLOS ONE*. 29 de fevereiro de 2012;7(2):e32662.
254. Chen X-M, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF. A Cellular Micro-RNA, let-7i, Regulates Toll-like Receptor 4 Expression and Contributes to Cholangiocyte Immune Responses against *Cryptosporidium parvum* Infection. *J Biol Chem*. 28 de setembro de 2007;282(39):28929–38.
255. Banerjee S, Xie N, Cui H, Tan Z, Yang S, Icyuz M, et al. MicroRNA let-7c Regulates Macrophage Polarization. *J Immunol*. 15 de junho de 2013;190(12):6542–9.
256. Zhou J, Yao W, Liu K, Wen Q, Wu W, Liu H, et al. MicroRNA let-7g regulates mouse granulosa cell autophagy by targeting insulin-like growth factor 1 receptor. *Int J Biochem Cell Biol*. 1º de setembro de 2016;78:130–40.
257. Liao Y-C, Wang Y-S, Guo Y-C, Lin W-L, Chang M-H, Juo S-HH. Let-7g Improves Multiple Endothelial Functions Through Targeting Transforming Growth Factor-Beta and SIRT-1 Signaling. *J Am Coll Cardiol*. 29 de abril de 2014;63(16):1685–94.
258. Liu M, Tao G, Liu Q, Liu K, Yang X. MicroRNA let-7g alleviates atherosclerosis via the targeting of LOX-1 in vitro and in vivo. *Int J Mol Med*. julho de 2017;40(1):57–64.
259. Rom S, Dykstra H, Zuluaga-Ramirez V, Reichenbach NL, Persidsky Y. miR-98 and let-7g\* Protect the Blood-Brain Barrier Under Neuroinflammatory Conditions: *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 1º de julho de 2015 [citado 24 de novembro de 2020]; Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1038/jcbfm.2015.154>
260. Wang M, Wang W, Wang J, Zhang J. MiR-182 promotes glucose metabolism by upregulating hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in NSCLC cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 02 de 2018;504(2):400–5.
261. Cheng H-P, Gong D, Zhao Z-W, He P-P, Yu X-H, Ye Q, et al. MicroRNA-182 Promotes Lipoprotein Lipase Expression and Atherogenesis by Targeting Histone Deacetylase 9 in Apolipoprotein E-Knockout Mice. *Circ J Off J Jpn Circ Soc*. 25 de 2017;82(1):28–38.
262. Qi R, Liu H, Liu C, Xu Y, Liu C. Expression and short-term prognostic value of miR-126 and miR-182 in patients with acute stroke. *Exp Ther Med*. janeiro de 2020;19(1):527–34.
263. Kouri FM, Hurley LA, Daniel WL, Day ES, Hua Y, Hao L, et al. miR-182 integrates apoptosis, growth, and differentiation programs in glioblastoma. *Genes Dev*. 1º de abril de 2015;29(7):732–45.
264. Lee Y, Bernstock JD, Klimanis D, Hallenbeck JM. Akt Protein Kinase, miR-200/miR-182 Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition Proteins in Hibernating Ground Squirrels. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 30 de janeiro de 2018 [citado 25 de novembro de 2020];11. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5797618/>

265. Du C, Weng X, Hu W, Lv Z, Xiao H, Ding C, et al. Hypoxia-inducible MiR-182 promotes angiogenesis by targeting RASA1 in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 28 de junho de 2015;34:67.
266. Kuo W-T, Yu S-Y, Li S-C, Lam H-C, Chang H-T, Chen W-S, et al. MicroRNA-324 in Human Cancer: miR-324-5p and miR-324-3p Have Distinct Biological Functions in Human Cancer. *Anticancer Res*. 10 de janeiro de 2016;36(10):5189–96.
267. Su XW, Chan AHY, Lu G, Lin M, Sze J, Zhou JY, et al. Circulating microRNA 132-3p and 324-3p Profiles in Patients after Acute Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144724.
268. Díaz I, Calderón-Sánchez E, Toro RD, Ávila-Médina J, de Rojas-de Pedro ES, Domínguez-Rodríguez A, et al. miR-125a, miR-139 and miR-324 contribute to Urocortin protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Sci Rep*. 21 de agosto de 2017;7(1):8898.
269. Kuang Y, Zheng X, Zhang L, Ai X, Venkataramani V, Kilic E, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells reduce autophagy in stroke mice by extracellular vesicle transfer of miR-25. *J Extracell Vesicles*. outubro de 2020;10(1):e12024.
270. Guo F, Han X, Zhang J, Zhao X, Lou J, Chen H, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation promotes neural stem cell proliferation via the regulation of MiR-25 in a rat model of focal cerebral ischemia. *PLoS One*. 2014;9(10):e109267.
271. Chi W, Meng F, Li Y, Li P, Wang G, Cheng H, et al. Impact of microRNA-134 on neural cell survival against ischemic injury in primary cultured neuronal cells and mouse brain with ischemic stroke by targeting HSPA12B. *Brain Res*. 10 de dezembro de 2014;1592:22–33.
272. Yang J, Liu S, Wang H, Liu Y, Liu Y. miR-134-5p inhibition reduces infarct-induced cardiomyocyte apoptosis via Creb1 upregulation. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc*. agosto de 2020;29(8):104850.
273. Zhang H, Liu X, Yang F, Cheng D, Liu W. Overexpression of HIF-1 $\alpha$  protects PC12 cells against OGD/R-evoked injury by reducing miR-134 expression. *Cell Cycle Georget Tex*. maio de 2020;19(9):990–9.
274. Xin C, Lu S, Li Y, Zhang Y, Tian J, Zhang S, et al. miR-671-5p Inhibits Tumor Proliferation by Blocking Cell Cycle in Osteosarcoma. *DNA Cell Biol*. setembro de 2019;38(9):996–1004.
275. Zhang B, Sun M, Wang J, Ma C, Hao T, Liu G, et al. MiR-671 ameliorates the progression of osteoarthritis in vitro and in vivo. *Pathol Res Pract*. julho de 2019;215(7):152423.
276. Chu Y, Yao Y, Li X. MiR-370 enhances cell cycle and represses lipid accumulation in porcine adipocytes. *Anim Biotechnol*. 3 de dezembro de 2019;1–9.
277. Sang K, Yi T, Huang X, Pan C, Zhou J, Yu L. MiR-370-5p inhibits the progression of breast cancer via targeting LUC7L3. *J Recept Signal Transduct Res*. 24 de setembro de 2020;1–9.
278. Du X, Wang S, Liu X, He T, Lin X, Wu S, et al. MiR-1307-5p targeting TRAF3 upregulates the MAPK/NF- $\kappa$ B pathway and promotes lung adenocarcinoma proliferation. *Cancer Cell Int*. 2020;20:502.

279. Zhou Y, Wang M, Shuang T, Liu Y, Zhang Y, Shi C. MiR-1307 influences the chemotherapeutic sensitivity in ovarian cancer cells through the regulation of the CIC transcriptional repressor. *Pathol Res Pract.* outubro de 2019;215(10):152606.
280. Wang Y-W, Zhao S, Yuan X-Y, Liu Y, Zhang K, Wang J, et al. miR-4732-5p promotes breast cancer progression by targeting TSPAN13. *J Cell Mol Med.* abril de 2019;23(4):2549–57.
281. Xu C-Y, Dong J-F, Chen Z-Q, Ding G-S, Fu Z-R. MiR-942-3p Promotes the Proliferation and Invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells by Targeting MBL2. *Cancer Control J Moffitt Cancer Cent.* dezembro de 2019;26(1):1073274819846593.
282. Zhang Q, Zhu B, Qian J, Wang K, Zhou J. miR-942 promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting RRM2B. *OncoTargets Ther.* 2019;12:8367–78.
283. Chen M, Li H, Shi Z, Peng W, Qin Y, Luo R, et al. High fluorescence quenching probe-based reverse fluorescence enhancement LFTS coupling with IS-primer amplification reaction for the rapid and sensitive Parkinson Disease-associated MicroRNA detection. *Biosens Bioelectron.* 1º de outubro de 2020;165:112278.
284. Yuchuan H, Ya D, Jie Z, Jingqiu C, Yanrong L, Dongliang L, et al. Circulating miRNAs might be promising biomarkers to reflect the dynamic pathological changes in smoking-related interstitial fibrosis: *Toxicol Ind Health* [Internet]. 10 de julho de 2012 [citado 27 de novembro de 2020]; Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233712452606>
285. Su S, Zhao Q, He C, Huang D, Liu J, Chen F, et al. miR-142-5p and miR-130a-3p are regulated by IL-4 and IL-13 and control profibrogenic macrophage program. *Nat Commun.* 5 de outubro de 2015;6(1):8523.
286. Xu R, Bi C, Song J, Wang L, Ge C, Liu X, et al. Upregulation of miR-142-5p in atherosclerotic plaques and regulation of oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in macrophages. *Mol Med Rep.* 1º de maio de 2015;11(5):3229–34.
287. Wang N, Zhang L, Lu Y, Zhang M, Zhang Z, Wang K, et al. Down-regulation of microRNA-142-5p attenuates oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced neuron injury through up-regulating Nrf2/ARE signaling pathway. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* maio de 2017;89:1187–95.
288. Tian C, Li Z, Yang Z, Huang Q, Liu J, Hong B. Plasma MicroRNA-16 Is a Biomarker for Diagnosis, Stratification, and Prognosis of Hyperacute Cerebral Infarction. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166688.
289. Rainer TH, Leung LY, Chan CPY, Leung YK, Abrigo JM, Wang D, et al. Plasma miR-124-3p and miR-16 concentrations as prognostic markers in acute stroke. *Clin Biochem.* junho de 2016;49(9):663–8.
290. Przanowska RK, Sobierajska E, Su Z, Jensen K, Przanowski P, Nagdas S, et al. miR-206 family is important for mitochondrial and muscle function, but not essential for myogenesis in vitro. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* junho de 2020;34(6):7687–702.
291. Wang R, Hu Y, Song G, Hao CJ, Cui Y, Xia H-F, et al. MiR-206 Regulates Neural Cells Proliferation and Apoptosis via Otx2. *Cell Physiol Biochem.* 2012;29(3–4):381–90.

292. He X-W, Shi Y-H, Zhao R, Liu Y-S, Li G-F, Hu Y, et al. Plasma Levels of miR-125b-5p and miR-206 in Acute Ischemic Stroke Patients After Recanalization Treatment: A Prospective Observational Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 1<sup>o</sup> de junho de 2019;28(6):1654–61.
293. Guo D, Ma J, Yan L, Li T, Li Z, Han X, et al. Down-Regulation of Lncrna MALAT1 Attenuates Neuronal Cell Death Through Suppressing Beclin1-Dependent Autophagy by Regulating Mir-30a in Cerebral Ischemic Stroke. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2017;43(1):182–94.
294. Wang P, Pan R, Weaver J, Jia M, Yang X, Yang T, et al. MicroRNA-30a regulates acute cerebral ischemia-induced blood-brain barrier damage through ZnT4/zinc pathway. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 5 de junho de 2020;271678X20926787.
295. Fu X, Shen Y, Wang W, Li X. MiR-30a-5p ameliorates spinal cord injury-induced inflammatory responses and oxidative stress by targeting Neurod 1 through MAPK/ERK signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* janeiro de 2018;45(1):68–74.
296. Wang P, Liang J, Li Y, Li J, Yang X, Zhang X, et al. Down-regulation of miRNA-30a alleviates cerebral ischemic injury through enhancing beclin 1-mediated autophagy. *Neurochem Res.* julho de 2014;39(7):1279–91.
297. Wei G, Liao C, Jian C, Liang L, Liu J, Tang Y, et al. Evaluation of miR-34b/c polymorphisms to the risk of ischemic stroke. *J Hypertens.* agosto de 2020;38(8):1481–7.
298. Guilbaud M, Gentil C, Peccate C, Gargaun E, Holtzmann I, Gruszczynski C, et al. miR-708-5p and miR-34c-5p are involved in nNOS regulation in dystrophic context. *Skelet Muscle.* 27 de 2018;8(1):15.
299. Gupta N, Jadhav S, Tan K-L, Saw G, Mallilankaraman KB, Dheen ST. miR-142-3p Regulates BDNF Expression in Activated Rodent Microglia Through Its Target CAMK2A. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:132.
300. Rider MA, Hurwitz SN, Meckes DG. ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. *Sci Rep.* 12 de abril de 2016;6(1):23978.
301. García-Romero N, Madurga R, Rackov G, Palacín-Aliana I, Núñez-Torres R, Asensi-Puig A, et al. Polyethylene glycol improves current methods for circulating extracellular vesicle-derived DNA isolation. *J Transl Med.* 11 de março de 2019;17(1):75.
302. Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, Hill AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J Extracell Vesicles.* 1<sup>o</sup> de janeiro de 2014;3(1):23743.
303. Koga Y, Yasunaga M, Moriya Y, Akasu T, Fujita S, Yamamoto S, et al. Exosome can prevent RNase from degrading microRNA in feces. *J Gastrointest Oncol.* dezembro de 2011;2(4):215–22.
304. Li D-B, Liu J-L, Wang W, Luo X-M, Zhou X, Li J-P, et al. Plasma Exosomal miRNA-122-5p and miR-300-3p as Potential Markers for Transient Ischaemic Attack in Rats. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:24.

305. Sun W, Wang X, Li J, You C, Lu P, Feng H, et al. MicroRNA-181a promotes angiogenesis in colorectal cancer by targeting SRCIN1 to promote the SRC/VEGF signaling pathway. *Cell Death Dis.* 19 de abril de 2018;9(4):1–13.
306. Li Y, Kuscu C, Banach A, Zhang Q, Pulkoski-Gross A, Kim D, et al. miR-181a-5p Inhibits Cancer Cell Migration and Angiogenesis via Downregulation of Matrix Metalloproteinase-14. *Cancer Res.* 1º de julho de 2015;75(13):2674–85.
307. Liu L, Wang N-H, Zhang Q, Li S-Y, Gu W-J, Wu Y. [Micro-ribonucleic acids participate in electroacupuncture intervention-induced improvement of ischemic stroke]. *Zhen Ci Yan Jiu Acupunct Res.* 25 de setembro de 2019;44(9):686–92.
308. Moon J, Xu L, Giffard RG. Inhibition of microRNA-181 reduces forebrain ischemia-induced neuronal loss. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* dezembro de 2013;33(12):1976–82.
309. Dong H, Weng C, Bai R, Sheng J, Gao X, Li L, et al. The regulatory network of miR-141 in the inhibition of angiogenesis. *Angiogenesis.* 2019;22(2):251–62.
310. Li J-Z, Li J, Liu B-Z. MicroRNA-328-3p inhibits malignant progression of hepatocellular carcinoma by regulating MMP-9 level. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* novembro de 2019;23(21):9331–40.
311. Li Y, Zhong W, Zhu M, Li M, Yang Z. miR-185 inhibits prostate cancer angiogenesis induced by the nodal/ALK4 pathway. *BMC Urol.* 4 de maio de 2020;20(1):49.
312. Wei J, Zhao Y. MiR-185-5p Protects Against Angiogenesis in Polycystic Ovary Syndrome by Targeting VEGFA. *Front Pharmacol.* 2020;11:1030.
313. Guo D, Ma J, Li T, Yan L. Up-regulation of miR-122 protects against neuronal cell death in ischemic stroke through the heat shock protein 70-dependent NF-κB pathway by targeting FOXO3. *Exp Cell Res.* 1º de agosto de 2018;369(1):34–42.
314. Tan JR, Tan KS, Yong FL, Armugam A, Wang CW, Jeyaseelan K, et al. MicroRNAs regulating cluster of differentiation 46 (CD46) in cardioembolic and non-cardioembolic stroke. *PLOS ONE.* 15 de fevereiro de 2017;12(2):e0172131.
315. Lee Y, Johnson KR, Hallenbeck JM. Global protein conjugation by ubiquitin-like-modifiers during ischemic stress is regulated by microRNAs and confers robust tolerance to ischemia. *PloS One.* 2012;7(10):e47787.
316. Xu L-J, Ouyang Y-B, Xiong X, Stary CM, Giffard RG. Post-stroke treatment with miR-181 antagomir reduces injury and improves long-term behavioral recovery in mice after focal cerebral ischemia. *Exp Neurol.* fevereiro de 2015;264:1–7.
317. Willcott MR. MestRe Nova. *J Am Chem Soc.* 16 de setembro de 2009;131(36):13180–13180.
318. Heude C, Nath J, Carrigan JB, Ludwig C. Nuclear Magnetic Resonance Strategies for Metabolic Analysis. *Adv Exp Med Biol.* 2017;965:45–76.
319. Karaman I. Preprocessing and Pretreatment of Metabolomics Data for Statistical Analysis. *Adv Exp Med Biol.* 2017;965:145–61.

320. Chong J, Wishart DS, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinforma*. 2019;68(1):e86.
321. Pinto J, Domingues MRM, Galhano E, Pita C, Almeida M do C, Carreira IM, et al. Human plasma stability during handling and storage: impact on NMR metabolomics. *The Analyst*. 7 de março de 2014;139(5):1168–77.
322. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res*. 04 de 2018;46(D1):D608–17.
323. Orsini F, Fumagalli S, Császár E, Tóth K, De Blasio D, Zangari R, et al. Mannose-Binding Lectin Drives Platelet Inflammatory Phenotype and Vascular Damage After Cerebral Ischemia in Mice via IL (Interleukin)-1 $\alpha$ . *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(11):2678–90.
324. Neglia L, Fumagalli S, Orsini F, Zanetti A, Perego C, De Simoni M-G. Mannose-binding lectin has a direct deleterious effect on ischemic brain microvascular endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. agosto de 2020;40(8):1608–20.
325. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*. 20 de novembro de 2014;515(7527):431–5.
326. Nam HS. Gut Microbiota and Ischemic Stroke: The Role of Trimethylamine N-Oxide. *J Stroke*. maio de 2019;21(2):151–9.
327. Bossi F, Peerschke EI, Ghebrehiwet B, Tedesco F. Cross-talk between the complement and the kinin system in vascular permeability. *Immunol Lett*. 30 de outubro de 2011;140(1–2):7–13.
328. Fumagalli S, De Simoni M-G. Lectin Complement Pathway and Its Bloody Interactions in Brain Ischemia. *Stroke*. 2016;47(12):3067–73.
329. de la Rosa X, Cervera A, Kristoffersen AK, Valdés CP, Varma HM, Justicia C, et al. Mannose-binding lectin promotes local microvascular thrombosis after transient brain ischemia in mice. *Stroke*. maio de 2014;45(5):1453–9.
330. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol*. 4 de setembro de 2020;
331. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, DuGar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 7 de abril de 2011;472(7341):57–63.
332. Cho CE, Taesuwan S, Malysheva OV, Bender E, Tulchinsky NF, Yan J, et al. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) response to animal source foods varies among healthy young men and is influenced by their gut microbiota composition: A randomized controlled trial. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(1).
333. Velasquez MT, Ramezani A, Manal A, Raj DS. Trimethylamine N-Oxide: The Good, the Bad and the Unknown. *Toxins*. 08 de 2016;8(11).
334. Fuertes-Martín R, Correig X, Vallvé J-C, Amigó N. Title: Human Serum/Plasma Glycoprotein Analysis by 1H-NMR, an Emerging Method of Inflammatory Assessment. *J Clin Med*. 27 de janeiro de 2020;9(2).

335. Malo A-I, Rull A, Girona J, Domingo P, Fuertes-Martín R, Amigó N, et al. Glycoprotein Profile Assessed by <sup>1</sup>H-NMR as a Global Inflammation Marker in Patients with HIV Infection. A Prospective Study. *J Clin Med*. 4 de maio de 2020;9(5).
336. Lee JY, Kim YH, Koh JY. Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 15 de outubro de 2001;21(20):RC171.
337. Wang Q, van Hoecke M, Tang XN, Lee H, Zheng Z, Swanson RA, et al. Pyruvate protects against experimental stroke via an anti-inflammatory mechanism. *Neurobiol Dis*. outubro de 2009;36(1):223–31.
338. Woo YJ, Taylor MD, Cohen JE, Jayasankar V, Bish LT, Burdick J, et al. Ethyl pyruvate preserves cardiac function and attenuates oxidative injury after prolonged myocardial ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg*. maio de 2004;127(5):1262–9.
339. Yi J-S, Kim T-Y, Kyu Kim D, Koh J-Y. Systemic pyruvate administration markedly reduces infarcts and motor deficits in rat models of transient and permanent focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*. abril de 2007;26(1):94–104.
340. Yu Y-M, Kim J-B, Lee K-W, Kim SY, Han P-L, Lee J-K. Inhibition of the cerebral ischemic injury by ethyl pyruvate with a wide therapeutic window. *Stroke*. outubro de 2005;36(10):2238–43.
341. Chaneton B, Hillmann P, Zheng L, Martin ACL, Maddocks ODK, Chokkathukalam A, et al. Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature*. 15 de novembro de 2012;491(7424):458–62.
342. Fernstrom JD. Large neutral amino acids: dietary effects on brain neurochemistry and function. *Amino Acids*. setembro de 2013;45(3):419–30.
343. Hovda KE, Mundal H, Urdal P, McMartin K, Jacobsen D. Extremely slow formate elimination in severe methanol poisoning: a fatal case report. *Clin Toxicol Phila Pa*. agosto de 2007;45(5):516–21.
344. Cigdem B, Bolayir A, Celik VK, Kapancik S, Kilicgun H, Gokce SF, et al. The Role of Reduced Polyamine Synthesis in Ischemic Stroke. *Neurochem J*. 1º de abril de 2020;14(2):243–50.
345. Pietzke M, Meiser J, Vazquez A. Formate metabolism in health and disease. *Mol Metab*. 1º de março de 2020;33:23–37.
346. Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F. Polyamines in aging and disease. *Aging*. 21 de agosto de 2011;3(8):716–32.
347. Connelly MA, Otvos JD, Shalaurova I, Playford MP, Mehta NN. GlycA, a novel biomarker of systemic inflammation and cardiovascular disease risk. *J Transl Med*. 27 de 2017;15(1):219.
348. Yang M, Huo X, Miao Z, Wang Y. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Inhibitor Tirofiban in Acute Ischemic Stroke. Vol. 79, *Drugs*. Springer International Publishing; 2019. p. 515–29.
349. De Meyer SF, Denorme F, Langhauser F, Geuss E, Fluri F, Kleinschnitz C. Thromboinflammation in stroke brain damage. *Stroke*. 2016;47(4):1165–72.
350. Newsholme P, Lima MMR, Procopio J, Pithon-Curi TC, Doi SQ, Bazotte RB, et al. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz J Med Biol Res*. fevereiro de 2003;36(2):153–63.

351. Shulman RG, Rothman DL. Interpreting functional imaging studies in terms of neurotransmitter cycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 de setembro de 1998;95(20):11993–8.
352. Rothman DL, Sibson NR, Hyder F, Shen J, Behar KL, Shulman RG. In vivo nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of the relationship between the glutamate-glutamine neurotransmitter cycle and functional neuroenergetics. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 29 de julho de 1999;354(1387):1165–77.
353. Veyrat-Durebex C, Corcia P, Piver E, Devos D, Dangoumau A, Gouel F, et al. Disruption of TCA Cycle and Glutamate Metabolism Identified by Metabolomics in an In Vitro Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol Neurobiol*. 1º de dezembro de 2016;53(10):6910–24.
354. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci CMLS*. março de 2004;61(6):657–68.
355. Fern R, Matute C. Glutamate receptors and white matter stroke. *Neurosci Lett*. 16 de 2019;694:86–92.
356. Chao N, Li S-T. Synaptic and extrasynaptic glutamate signaling in ischemic stroke. *Curr Med Chem*. 2014;21(18):2043–64.
357. Kostandy BB. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol*. abril de 2012;33(2):223–37.

## ANEXOS

## 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – UNICAMP

<b>FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - UNICAMP (CAMPUS CAMPINAS)</b>	
--	---

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** BIORREPOSITÓRIO  
 ESTUDOS DE GENÉTICA MOLECULAR EM DOENÇAS NEUROPSIQUIÁTRICAS  
 FASE I

**Pesquisador:** Iscia Teresinha Lopes Cendes

**Área Temática:** Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 12112913.3.0000.5404

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas da UNICAMP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 257.020

**Data da Relatoria:** 12/04/2013

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um projeto para implantação de biorepositório de doenças neuro-psiQUIÁTRICAS e casos-controle. O estudo prevê recrutamento e coleta de 700 pacientes e 300 indivíduos controle.

O presente projeto pretende estudar os aspectos moleculares das seguintes doenças: epilepsias, malformações do desenvolvimento cortical, coreias, ataxias, paraparesias espásticas, distonias, transtorno afetivo bipolar, esquizofrenia, doenças musculares, doenças mitocondriais, doença de Parkinson, acidente vascular cerebral e demências. O projeto está dividido em sub-projetos, com a descrição detalhada das estratégias que serão utilizadas para cada uma dessas doenças.

Serão utilizadas diversas técnicas de biologia molecular para identificação de mutações conhecidas ou novas, como PCR, sequenciamento convencional e de terceira geração e análises de bioinformática. No Subprojeto 1 (Epilepsias e Malformações do Desenvolvimento Cortical), serão avaliadas mutações através da implantação da tecnologia de sequenciamento, baseada em equipamento de terceira geração e um novo sistema de detecção eletroquímico, sistema Ion Torrent®. No subprojeto 2 será realizada a captura e o sequenciamento do exoma em amostras de DNA de

<b>Endereço:</b> Rua Tessália Vieira de Camargo, 126	<b>CEP:</b> 13.083-987
<b>Bairro:</b> Barão Geraldo	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> CAMPINAS
<b>Telefone:</b> (19)3521-8936	<b>Fax:</b> (19)3521-7167
<b>E-mail:</b> cep@fcm.unicamp.br	

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
MÉDICAS - UNICAMP  
(CAMPUS CAMPINAS)



indivíduos afetados por formas familiares de epilepsia mioclônica juvenil (EMJ), epilepsia do lobo temporal (ELT) e benigna rolandica epilepsia (BRE) e Malformações do desenvolvimento cortical (MCD) nas quais as mutações já descritas não foram identificadas. Nessa investigação, serão utilizados kits de captura e enriquecimento Illumina TruSeq®, além do sequenciamento 11 usando a Illumina Hi-seq 2.000. Após o sequenciamento, será realizada análise de bioinformática nos dados obtidos a fim de identificar variantes potencialmente patogênicas.

Os pacientes serão recrutados nos ambulatórios do HC-UNICAMP (Neurogenética, Epilepsia, Epilepsia de difícil controle, Epilepsia infantil, Distúrbio do Movimento, Doenças Neuromusculares, Distonias, Toxina Botulínica, Demências, Neurovascular ou Psiquiatria). Será coletado de 20-30 ml de sangue periférico para o estudo, além do exame clínico e anamnese. Será coletados dados do prontuário médico.

**Objetivo da Pesquisa:**

Identificar as mutações responsáveis pelos respectivos fenótipos, em um grupo de doenças neuropsiquiátricas, incluindo: epilepsias, malformações do desenvolvimento cortical, coreias, ataxias, paraparesias espásticas, distonias, transtorno afetivo bipolar, esquizofrenia, doenças musculares, doenças mitocondriais, acidente vascular cerebral, doença de Parkinson e demências.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os procedimentos a serem realizados são de pequeno risco para o indivíduo, sendo o principal deles a coleta de sangue por punção venosa.

Como benefícios, em alguns casos será possível a identificação das mutações associadas às doenças dos pacientes incluídos no estudo, o que implica na possibilidade de algoritmos mais eficientes de diagnóstico e tratamento. Os autores alertam que, muitas vezes, a mutação não resulta uma mudança no tratamento, o que é compreensível quando se trata de estudos genéticos.

Informações geradas durante o projeto e que possam ter implicações na confirmação diagnóstica de indivíduos sintomáticos serão comunicadas aos profissionais responsáveis pelo acompanhamento destes pacientes, nas sessões de orientação e aconselhamento genético dos ambulatórios de Neurogenética, cuja pesquisadora principal é a responsável.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto está bem escrito e detalhado, assim como os procedimentos que serão aplicados aos voluntários saudáveis e portadores de doença. apresenta relevância científica e social, a médio e longo prazos. O estudo será patrocinado pelo próprio pesquisador. Foram acrescentadas ao projeto principal as informações sobre o local onde serão recrutados e onde serão coletados os exames do grupo controle.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE está bem redigido, é de fácil entendimento para o voluntário e prevê armazenamento de

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: csp@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
MÉDICAS - UNICAMP  
(CAMPUS CAMPINAS)



material biológico. Estão presentes todos os termos de apresentação obrigatória previstos pela Resolução 196/96 e complementares, assim como o "Regulamento do Biorepositório de Doenças Neuropsiquiátricas".

**Recomendações:**

Nada a declarar.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Foram acrescentadas ao projeto principal as informações sobre o recrutamento dos voluntários do grupo controle, com priorização inicial para membros da família de pacientes, porém não portadores das doenças. As amostras serão coletadas nos ambulatórios de Genética e Neurologia HC-Unicamp e Hemocentro-UNICAMP.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado em reunião do colegiado, em 23 de Abril de 2013.

CAMPINAS, 26 de Abril de 2013

---

**Assinador por:**  
**Fátima Aparecida Bottcher Luiz**  
**(Coordenador)**

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