

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

ANA BEATRIZ LUCAS DE MOURA RAFAEL

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE CAV-1 COM
COMPLICAÇÕES CEREBROVASCULARES EM PACIENTES PEDIÁTRICOS
COM ANEMIA FALCIFORME**

**RECIFE
2023**

ANA BEATRIZ LUCAS DE MOURA RAFAEL

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE CAV-1 COM
COMPLICAÇÕES CEREBROVASCULARES EM PACIENTES PEDIÁTRICOS
COM ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal de Pernambuco como
parte dos requisitos exigidos para obtenção
do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo
Co-orientador: Prof. Dr. Igor Farias Domingos

**RECIFE
2023**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Rafael, Ana Beatriz Lucas de Moura.

Investigação da associação de polimorfismos no gene CAV-1 com complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com anemia falciforme. / Ana Beatriz Lucas de Moura Rafael. – 2023.

78 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra.

Coorientador: Antonio Roberto Lucena de Araújo.

Coorientador: Igor Farias Domingos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Genética, 2023.

Inclui referências.

1. Anemia falciforme. 2. AVC. 3. Caveolina-1 - CAV-1. 4. Doença cerebrovascular. I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti. (orient.). II. Araújo, Antonio Roberto Lucena de. III. Domingos, Igor Farias. IV. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-087

ANA BEATRIZ LUCAS DE MOURA RAFAEL

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE CAV-1 COM
COMPLICAÇÕES CEREBROVASCULARES EM PACIENTES PEDIÁTRICOS
COM ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética. Área de concentração: Genética humana.

Aprovado em: 31/03/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Jaqueline De Azevedo Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Paula Sandrin Garcia
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Pedro Luiz De França Neto
Universidade Federal de Pernambuco

Agradecimentos

À UFPE e ao PPGG (Programa de Pós-Graduação em Genética) pela oportunidade de crescimento profissional;

Ao HEMOPE e seus funcionários pelo apoio e infraestrutura cedidos e aos pacientes com anemia falciforme que voluntariamente se dispuseram a participar desta pesquisa;

Ao Cnpq pelo apoio financeiro;

Ao Laboratório Central do Centro de Biociências (UFPE) pela infraestrutura fornecida, bem como seus funcionários, professores, orientadores e todos aqueles que me ajudaram cientificamente na construção deste trabalho. Agradeço especialmente Gabriela Arcanjo que me instruiu e me acompanhou desde o início da minha vida científica, meus eternos agradecimentos e admiração.

Agradeço infinitamente a Danízia Menezes que esteve junto á mim em todo esse processo (e muitos outros), que não mediu esforços para me ajudar, confortar, acompanhar e mais outra imensidão de verbos que não caberiam aqui. Sou infinitamente grata por ter encontrado uma amizade tão recíproca e genuína em um mundo com tanta competição de egos. Entramos juntas, trilhamos juntas e saímos juntas. Agradeço também a Maria Luiza Salustiano por toda amizade construída, todo apoio emocional e científico oferecidos a mim durante toda esta etapa. Sem vocês eu não teria conseguido.

À minha família pelo apoio incondicional para além dos muros da universidade e por acreditarem sempre no meu melhor. Agradeço em especial ao meu pai Carlos, minha madrastra Cris e minha prima Laura pelos pequenos detalhes e cuidados cotidianos feitos como forma de reafirmarem: você nunca estará só. Nunca saberei agradecer suficientemente.

RESUMO

Dentre as complicações clínicas da anemia falciforme (AF), o acidente vascular cerebral (AVC) é a de maior gravidade. A ultrassonografia com Doppler transcraniano (DTC) estratifica o risco de AVC, levando ao início da terapia profilática. Entretanto, o DTC apresenta algumas limitações, sendo necessária a identificação de novos indicadores que o auxiliem. O *CAV1* é um gene interessante para avaliação desse risco e codifica caveolina-1: proteína envolvida na diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), importante vasodilatador. Para este estudo foram selecionados 3 polimorfismos no gene *CAV1*: rs3807989 (G>A), rs7804372 (T>A) e rs1997623(A>C). Selecionamos 339 indivíduos com AF menores de 20 anos de idade acompanhados na Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), Recife-PE. As genotipagens para os polimorfismos ocorreram por PCR em tempo real com discriminação alélica utilizando sondas TaqMan no aparelho QuantStudio® 5. Os polimorfismos rs3807989 e rs7804372 não se mostraram associados estatisticamente com as variáveis analisadas. O rs1997623 demonstrou associação estatisticamente relevante com o AVC ($p=0,003$) e Doença Cerebrovascular ($P=0,011$). Além disso, o alelo selvagem "A" demonstrou estar mais relacionado com o AVC ($P = 0.0032$; OR: 2.568; IC: 1.374 – 4.655) e com a DCV ($P = 0.0092$; OR: 1.950; IC: 1.205 – 3.160) quando comparado ao alelo variante "C". Estes achados conferem ao rs1997623 um caráter protetivo contra essas condições avaliadas, sendo ainda necessários estudos futuros.

Palavras chave: Anemia Falciforme; AVC; Caveolina-1; *CAV1*; Doença cerebrovascular.

ABSTRACT

Among the clinical complications of sickle cell anemia (SCA), the stroke is the most serious. Transcranial Doppler (TCD) is a screening tool that predicts the risk of stroke, leading to the initiation of prophylactic therapy. However, the TCD has some intrinsic limitations, requiring the identification of new indicators to help it. The *CAV1* is an interesting gene for assessing this risk and is responsible for encoding the caveolin-1 protein. This protein regulates signaling pathways and processes that are involved in the pathophysiology of stroke in SCA, mainly by negatively regulating the bioavailability of nitric oxide (NO), an important vasodilator. For this study, 3 polymorphisms in the *CAV1* gene were selected: rs3807989 (G>A), rs7804372 (T>A) and rs1997623 (A>C). We selected 339 individuals with SCA under 20 years of age followed at the Pernambuco Hematology and Hemotherapy Foundation (HEMOPE), Recife-PE. Genotyping for polymorphisms was performed by real-time PCR with allelic discrimination using TaqMan probes in the QuantStudio® 5 device. Polymorphisms rs3807989 and rs7804372 were not statistically associated with the analyzed variables. The rs1997623 showed a statistically significant association with stroke ($p=0.003$) and cerebrovascular disease ($p=0.011$). Furthermore, the wild-type "A" allele was shown to be more closely related to stroke ($P = 0.0032$; OR: 2.568; CI: 1.374 – 4.655) and CVD ($P = 0.0092$; OR: 1.950; CI: 1.205 – 3.160) when compared to the variant allele "C". These findings give rs1997623 a protective character against these evaluated conditions, but further studies are needed to confirm these results because stroke is a multifactorial disease.

Keywords: Sickle Cell Anemia; Stroke; Caveolin-1; *CAV1*; Cerebrovascular disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mapa com estimativa numérica de recém nascidos com anemia falciforme a cada 100.000 nascimentos por país em 2015 **(pág. 19)**

Figura 2: Complicações clínicas da doença falciforme **(pág. 23)**

Figura 3: Diagrama da área onde o transdutor do Doppler Transcraniano é posicionado para obter os sinais das artérias intracranianas **(pág. 26)**

Figura 4: Algoritmo para DTC em pacientes pediátricos com doença falciforme **(pág. 27)**

Figura 5: Indicações para transfusão de hemácias na AF **(pág. 29)**

Figura 6: Esquema de ativação da eNOS em caveolas endoteliais **(pág. 36)**

Figura 7: Probabilidade de acometimento pelo AVC dependente do genótipo para o polimorfismo rs1997623 **(pág. 48)**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais transcritos, posição genômica e no transcrito para cada SNP, segundo o banco de dados *Ensembl*. (Pág 39)

Tabela 2: Caracterização laboratorial dos pacientes incluídos no estudo (pág. 44)

Tabela 3: Caracterização clínica dos pacientes incluídos no estudo (pág. 45)

Tabela 4: Frequências alélicas e genotípicas (pág. 46)

Tabela 5: O modelo univariado de riscos proporcionais de Cox para os SNPS rs7804372 e rs3807989 tendo como variável de falha a ocorrência do AVC. (pág 46)

Tabela 6: Associação do polimorfismo rs1997623 do gene *CAV1* de acordo com o modelo de herança codominante (pág. 47)

Tabela 7: Análise alélica do polimorfismo rs1997623, para o desenvolvimento do AVC (pág. 49)

Tabela 8: Análise alélica do polimorfismo rs1997623, para o desenvolvimento da DCV (pág. 49)

Tabela 9: O modelo univariado de riscos proporcionais de Cox para O SNP rs1997623 tendo como variável de falha a ocorrência do AVC. (pág 50)

Tabela 10: O modelo multivariado de riscos proporcionais de Cox para O SNP rs1997623 tendo como variável de falha a ocorrência do AVC. (pág 50)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ITEM	DEFINIÇÃO
2,3 – DPG	2,3 - Difosfoglicerato
A	Adenina
AF	Anemia Falciforme
AIT	Ataque isquêmico transitório
ARB	Árabe-indiano
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BABY HUG	do inglês, <i>Pediatric Hydroxyurea in sickle cell anemia</i>
BEM	Benin
BI	Bilirrubina Indireta
BT	Bilirrubina Total
CAR	República Central Africana
CAV1	Gene codificante da Caveolina-1
Cav-1	Proteína caveolina 1
Cav-2	Proteína caveolina 2
Cav-3	Proteína caveolina 3
CEP	Comitê de ética e Pesquisa
CEU	População árabe indiana
CNS	Conselho Nacional de saúde
CSSCD	do inglês, <i>Cooperative study of sickle cell disease</i>
DCV	Doença Cerebrovascular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTC	Doppler transcraniano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ENOS	Oxido nítrico sintase endotelial
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FRAVC	Fatores de risco para o AVC
G	Guanina
GWAS	do inglês, <i>Genome-Wide Association</i>

	<i>Study</i>
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
Hb	Hemoglobina
Hb S/ β^0	S/ β^0 talassemia
HbA	Hemoglobina A
HBB	Gene da β globina
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HT	Hematócrito
HU	Hidroxiuréia
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1
IS	Infarto silencioso
LabCen	Laboratório Central CB/UFPE
LDH	Lactato desidrogenase
MAF	Do inglês “Minor allele frequency”
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NHCL	Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial
NO	Óxido nítrico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Ph	Potencial hidrogeniônico
PLQ	Plaquetas
Po2	Pressao de oxigênio
RBC	do inglês, <i>Red Blood Cells</i>
Rh	Rhesus
RMN	Resonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
SEM	Senegal
SNP	do inglês, <i>Single nucleotide</i>

	<i>polymorphism</i>
STA	Síndrome torácica aguda
STOP	Do inglês, <i>Stroke prevention trial in sickle cell anemia</i>
SWITCH	do inglês, <i>Stroke with transfusions changing to hydroxyurea</i>
TC	Tomografia computadorizada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Fator de crescimento transformador
TWITCH	do inglês, <i>TCD with transfusions change to hydroxyurea</i>
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VCM	Volume corpuscular médio
VMMF	Média da velocidade máxima de fluxo
WBC	do inglês, <i>White blood cells</i>
YRI	População africana

LISTA DE SÍMBOLOS

ITEM	DEFINIÇÃO
%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
cm/s	Centímetros por segundo
dNTPs	Desoxinucleotídeos
kb	Kilobase
kg	Quilograma
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
P	Significância
p	Braço curto do cromossomo
pb	Pares de bases
pH	Potencial Hidrogeniônico
q	Braço longo do cromossomo
U	Unidade
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
°C	Graus Célsius
'	Minuto
"	Segundo
=	Igual a
>	Maior que
≥	Maior ou igual a
<	Menor que

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1 ANEMIA FALCIFORME	18
2.1.1 Etiologia e epidemiologia	18
2.1.2 Fisiopatologia	19
2.1.3 Manifestações Clínicas.....	22
2.2 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL.....	23
2.2.1 Acidente vascular cerebral e a anemia falciforme.....	23
2.2.2 Doppler Transcraniano na detecção do AVC.....	25
2.3 MEDIDAS DE PREVENÇÃO DO AVC.....	27
2.3.1 Terapia transfusional.....	27
2.3.2 Terapia com Hidroxiuréia	30
2.4 MODULADORES GENÉTICOS	31
2.5 CAVEOLINA	33
2.5.1 O óxido nítrico na anemia falciforme	33
2.5.2 Gene CAV-1 e a função da sua proteína.....	34
2.5.3 Polimorfismos no gene CAV-1	37
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos específicos	40
4. METODOLOGIA.....	41
4.1 Casuística	41
4.2 Critérios de inclusão.....	42
4.3 Critérios de exclusão.....	42
4.4 Análise hematológica e clínica	42
4.5 Análise molecular.....	42
4.5.1 Extração do DNA genômico e genotipagem	42
4.6 Análise Estatística	43
4.7 Aspectos Éticos.....	43
5. RESULTADOS	44
5.1 Descrição da coorte.....	44
5.2 Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos do gene CAV1.....	45

5.3 Associações dos polimorfismos do gene <i>CAV1</i> com a ocorrência das principais complicações cerebrovasculares na AF	46
6.0 DISCUSSÃO	51
7.0 CONCLUSÕES.....	55
8.0 REFERÊNCIAS	56
9.0 ANEXOS	69
9.1 Parecer do comitê de ética.....	69
9.2 Termo de Assentimento livre e esclarecido – menores de idade	70
9.3 Termo de Assentimento livre e esclarecido - Responsáveis	72
9.4 Tabela suplementar 1	74
10. CURRICULUM LATTES.....	75

1.INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é a doença hereditária monogênica mais comum do mundo e é causada pela troca do aminoácido ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia da β -globina devido a substituição de um único nucleotídeo, **GAG** > **GTG** no cromossomo 11p15.5, codificando uma hemoglobina anormal: a hemoglobina S (HbS). Algumas condições, como por exemplo a hipóxia, promovem a polimerização dessa hemoglobina. À medida que a desoxi-HbS polimeriza e as fibras se alinham, a forma do eritrócito é alterada, adquirindo morfologia semelhante a uma foice. Esses eritrócitos deformados e rígidos podem obstruir o fluxo sanguíneo normal na microcirculação e, assim, induzir a isquemia em tecidos distais devido ao bloqueio vascular, que é a base para muitas complicações da AF.

O acúmulo de polímeros de HbS dentro das hemácias falcizadas resulta em lesão celular e, em larga escala, os eritrócitos danificados ficam mais susceptíveis a eventos hemolíticos e vaso-oclusivos, caracterizando assim, os principais eventos envolvidos na fisiopatologia da AF. Dentre as complicações clínicas da AF destacam-se: episódios vaso-oclusivos, síndrome torácica aguda, necrose avascular, úlceras nas pernas, priapismo, retinopatia e doença cerebrovascular, a qual inclui complicações como ataque isquêmico transitório, infarto silencioso, Doppler Transcraniano de alto risco e acidente vascular cerebral (AVC), sendo esta última a de maior gravidade, e de grande impacto e prevalência em indivíduos pediátricos com AF.

O AVC pode ser definido como um evento neurológico agudo secundário à oclusão de uma artéria ou a uma hemorragia, com consequente isquemia e/ou sinais e sintomas neurológicos. Os eventos cerebrovasculares constituem uma importante complicação clínica da AF por possuírem graves consequências na qualidade de vida do paciente, constituindo a causa mais relevante de distúrbios neurocognitivos e aumento da morbidade entre pacientes jovens. Estima-se que as crianças com AF quando comparadas a crianças sem a HbS, possuem um risco 300 vezes maior de serem acometidas pelo AVC na forma de infartos cerebrais silenciosos, ataques isquêmicos transitórios, isquêmicos evidentes ou hemorrágicos, sendo a disfunção endotelial e as anormalidades da coagulação os principais mecanismos patogênicos para a ocorrência do dessa complicação em pacientes com AF.

A ultrassonografia com Doppler transcraniano (DTC) das artérias cerebrais é uma ferramenta de triagem eficaz em crianças com AF. A velocidade elevada do fluxo sanguíneo cerebral nesses vasos pressagia o risco de acidente vascular cerebral e pode levar ao início da terapia profilática. Estenose ou oclusão nas artérias intracranianas são identificadas no DTC pelo aumento do fluxo sanguíneo, resultante do estreitamento dos vasos. Apesar de não invasivo e de baixo custo, o DTC apresenta algumas limitações como a alta dependência do operador, a incapacidade de detectar velocidades em todos os pacientes (alguns obtêm resultado inadequado ou não conclusivo), particularmente aqueles com janelas ósseas ruins, baixa especificidade para o AVC e não é capaz de prever uma isquemia “silenciosa”.

Diante dessas limitações intrínsecas do DTC, que dificultam a estratificação de risco em alguns pacientes, vem à tona a necessidade da identificação de novos marcadores genéticos que tenham correlação com o desenvolvimento de AVC nos pacientes com AF, para que sejam utilizados como ferramenta de suporte aos resultados do Doppler. Com isso, os principais candidatos para a avaliação da predisposição ao AVC em pacientes falciformes incluem genes envolvidos na biologia do óxido nítrico, lesão endotelial, trombose e inflamação.

Neste contexto, um interessante candidato é o gene *CAV-1* responsável por codificar a proteína caveolina-1. Essa proteína é um componente estrutural essencial das caveolas que regula vias de sinalização como receptor acoplado à proteína G, tirosina quinases, eNOS e vias MAPK associadas à inflamação e alterações fenotípicas na parede vascular. Por isso, desempenha um papel importante em doenças cardiovasculares, incluindo o AVC. A Caveolina-1, proteína transmembrana integral de 21 kDa, é um regulador negativo bem conhecido da atividade da enzima eNOS em células endoteliais vasculares mantendo-a em um estado inativo, reduzindo assim a biodisponibilidade desse importante vasodilatador o que favorece a vaso-oclusão. Além disso, o NO demonstrou reduzir a transcrição de várias moléculas de adesão endotelial como ICAM-1 e VCAM-1 e famílias da selectina (E- e P-selectina) inibindo a ativação plaquetária, demonstrando estar envolvido em diversos fatores que influenciam o cenário de desenvolvimento do AVC.

Uma vez que variantes genéticas parecem estar implicadas na fisiopatologia do AVC, estudos relacionados com a elucidação de sua influência frente a incidência de doença cerebrovascular são úteis a fim de fornecer uma alternativa de teste prognóstico. Com isso, seria possível a identificação precoce de crianças que apresentam alto risco de desenvolver esta complicação clínica, diminuindo a ocorrência de acidentes vasculares cerebrais primários em portadores de AF através de tratamentos preventivos necessários.

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ANEMIA FALCIFORME

2.1.1 Etiologia e epidemiologia

A anemia falciforme (AF) é uma doença autossômica recessiva hereditária e está entre as doenças monogênicas mais comuns do mundo acontecendo devido a uma mutação pontual no gene codificante da cadeia β -globina (HBB), localizado no cromossomo 11 (Habara & Steinberg, 2016; Osunkwo et al., 2021). Em 1910, a AF foi primeiramente descrita por Herrick e posteriormente a sua mutação foi caracterizada por Ingram et. al como uma substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina na sexta posição da cadeia polipeptídica da β -Globina (James, 1910; Kornberg & Krebs, 1957). Essa substituição de aminoácidos é proveniente da troca de adenina por timina no sexto códon do gene *HBB* (*HBB*; β S $\text{GAG} \rightarrow \text{GTG}$; glu6val), resultando na codificação de uma hemoglobina instável que ficou conhecida como Hemoglobina S (HbS) (Frenette et al., 2007; Onimoe & Rotz, 2020; Vorst, 2020).

A distribuição geográfica do alelo β s sofre influencia de dois fatores principais: a endemicidade da malária e os movimentos populacionais migratórios. A AF se mostra altamente prevalente em grandes áreas na África Subsaariana, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Índia (Figura 1), sugerindo que o gene responsável pelo distúrbio da hemoglobina falciforme poderia atingir altas frequências devido à resistência conferida contra a malária no estado de portador heterozigótico, conhecido também como traço falciforme (HbAS) (Kato et al., 2018; Kirkham & Lagunju, 2021; Piel et al., 2010, 2013). Estimativas indicam que a cada ano aproximadamente 300.000 bebês nasçam com AF e que esses nascimentos ocorrem em sua maioria em 3 países: Nigéria, República Democrática do Congo e Índia. Devido ao tráfico de escravos e movimentos migracionais a AF se expandiu atingindo todo o Globo e estima-se que no ano de 2050 a taxa de nascimento de pessoas com essa mutação seja de 400.000 recém nascidos ao ano por todo o mundo (Butz & Christopher S. von Bartheld, 2017; Johnson, 2016; Piel et al., 2010). De acordo com a Carga Global de Doença (do inglês *Global Burden of Disease* – GBD), 3,2 milhões de pessoas vivem no mundo com a Doença Falciforme (DF), 43

milhões são portadoras do traço (portadores heterozigóticos) e 176.000 pessoas morrem por ano em decorrência de complicações da doença (Sundd, 2019).

Devido ao intenso tráfico negreiro para o Brasil durante a escravidão, distribuição do alelo β_s no país é bastante heterogênea, sendo a prevalência de heterozigotos para a HbS maior nas regiões norte e nordeste (6% a 10%) em comparação as demais regiões brasileiras. No estado de Pernambuco, um em cada 23 recém-nascidos vivos possui o traço falciforme e um em cada 1.400 nasce com a doença falciforme (BRASIL. Ministério da Saúde, Cançado, & Jesus, 2016).

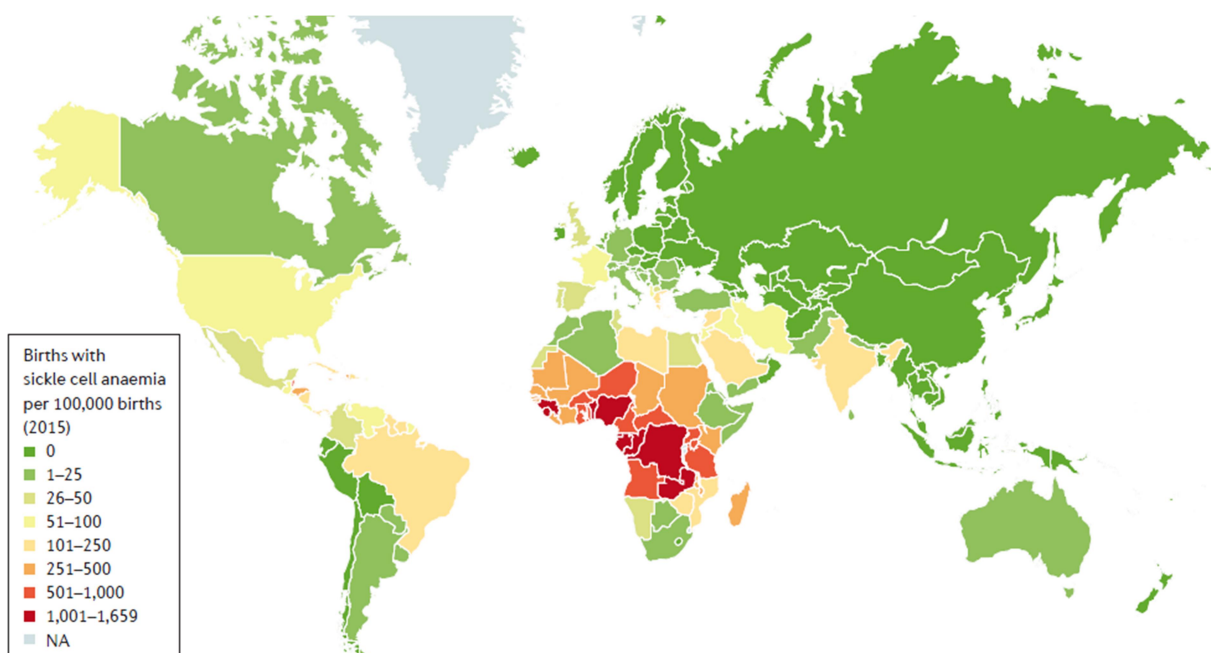


Figura 1: Mapa com estimativa numérica de recém nascidos com anemia falciforme a cada 100.000 nascimentos por país em 2015 (Kato et al., 2018).

2.1.2 Fisipatologia

A hemoglobina S possui algumas características peculiares e dentre elas, a característica chave é a sua instabilidade que leva a polimerização. Quando desoxigenada, essa hemoglobina expõe seus motivos hidrofóbicos de valina e se polimeriza no interior eritrócito que irá de deformar assumindo formato de foice. Estudos de cinética da polimerização da HbS demonstraram que a formação do polímero é de ordem exponencial em função da quantidade de hemoglobina, demonstrando o papel crucial da concentração de HbS no fenômeno da falcização. Além da concentração da HbS, outros fatores contribuem para a polimerização como o grau de desoxigenação da célula, pH, concentração intracelular de Hb fetal (HbF)

e temperatura (Franceschi et al., 2011; Kato et al., 2007; Lizarralde-Iragorri & Shet, 2020; Vorst, 2020).

A polimerização da HbS é um evento dinâmico e reversível até certo ponto. A molécula de hemoglobina pode se polimerizar e quando níveis mais altos de oxigênio são novamente alcançados, pode se despolimerizar. Essa reversibilidade da polimerização da HbS e consequentemente da falcização da hemácia é limitada pois ao atingir o ponto crítico, com alterações na membrana eritrocitária decorrentes das falcizações sucessivas, o eritrócito se tornará permanentemente falcizado (Darbari et al., 2020; Eaton, 2022; Ferrone, 2018).

Devido a polimerização intracelular da molécula da HbS, a forma bicôncava e flexível normal da hemácia é esticada em uma forma rígida alongada. O evento de falcização altera as propriedades da membrana celular eritrocitária por modificações nos seus componentes lipídicos e proteicos, reduzindo sua flexibilidade, promovendo maior aderência ao endotélio vascular e alterando interações da hemácia com leucócitos e plaquetas (Azar & Wong, 2017; Glaros et al., 2021; Zhou et al., 2011). Em adição à mudança na forma do eritrócito, os polímeros também têm um impacto na membrana da célula, levando a uma exposição extracelular de proteínas e glicolipídeos que normalmente são encontrados dentro da célula (Ballas, 2018; Darbari et al., 2020; Ware et al., 2017).

Nas hemácias falcizadas podemos observar a modificação assimétrica da membrana com perda de fosfolípidos e exposição da fosfatidilserina (PS) na face extracelular. A fosfatidilserina possui um papel importante no cenário fisiopatológico da AF por estar envolvida na ativação da coagulação e na sinalização aos macrófagos via Anexina V para destruição dessas hemácias através da fagocitose. (Desai et al., 2012; Nader, Romana, Guillot, et al., 2020). A esse tipo de destruição eritrocitária por captura do sistema retículo endotelial chamamos de hemólise extravascular, evento que representa 70% da intensa hemólise sofrida pelos pacientes. Os 30% restantes decorre de um outro tipo de hemólise denominado intravascular, onde é necessária a ativação do sistema complemento através da detecção de alterações membranares (Rees et al., 2010). Devido a essas lesões celulares sofridas pelos eritrócitos falcizados e os eventos hemolíticos relacionados,

haverá uma redução do tempo de meia-vida eritrocitário de 120 dias para 16-20 dias (Kato et al., 2018).

Em larga escala, esses eritrócitos danificados promovem efeitos hemolíticos e também eventos vasoclusivos, caracterizando o fenótipo principal da AF (Thein et al., 2017). A vaso-oclusão é um processo multifatorial caracterizado por inflamação, adesão e agregação multicelular envolvendo hemácias falcizadas, células endoteliais, plaquetas e outras células sanguíneas. Esse tipo de bloqueio vascular ocorre com mais frequência na microvasculatura dos pacientes mas pode acometer também grandes vasos levando a hipóxia, isquemia, dano tecidual e mantendo o estado de inflamação crônica no organismo (Darbari et al., 2020; Gemel et al., 2022).

Um dos fatores que compõe o cenário favorável para eventos vaso oclusivos na AF é a diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO). Com a hemólise, a hemoglobina livre no plasma interage com NO produzindo metahemoglobina, contribuindo com a depleção deste gás, que é um importante vasodilatador. Durante os últimos 20 anos, estudos clínicos centraram-se na hipótese de que diminuição da disponibilidade e sinalização de NO desempenham um papel central na fisiopatologia das complicações da AF, incluindo vaso-oclusão e dor. Vários eventos moleculares certamente poderiam aumentar a eliminação e diminuir a produção de NO, levando assim à diminuição da sua biodisponibilidade. (Hallmark et al., 2021; Kato et al., 2017).

Além de influenciar na depleção do NO, a hemólise pode estimular a produção de espécies reativas de oxigênio e a inflamação intravascular (Piccin et al., 2019; Rehman et al., 2021). O endotélio ativado passa a expressar maior quantidade de moléculas de adesão como por exemplo a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), de adesão vascular 1 (VCAM-1) e selectinas tanto endoteliais como plaquetárias. Assim, hemólise crônica está relacionada ao aumento de radicais livres no ambiente intra e extracelular em células falciformes. Este processo é cíclico, esgotando os sistemas antioxidantes e causando estresse oxidativo (Delesderrier et al., 2020). Não obstante, devido á anemia, os pacientes com AF cursam com níveis mais elevados de reticulócitos que por sua vez, são também bastante adesivos favorecendo o contexto vasooclusivo (Jang et al., 2021; Sundd, 2019).

2.1.3 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas na AF possuem caráter sistêmico, atingindo diversos órgãos e tecidos. Os locais de extensão dos danos diferem entre os pacientes, mas os locais mais comuns incluem os ossos, pulmões, baço, cérebro, coração, pele e rins (Gemel et al., 2022). Algumas dessas manifestações clínicas ocorrem de maneira aguda e outras são resultado de danos crônicos que se estendem ao longo da vida do indivíduo com AF (Kato et al., 2018; Williams & Thein, 2018). Os eventos fisiopatológicos mais determinantes na origem da grande maioria dos sinais e sintomas presentes no quadro clínico dos pacientes são representados pela ocorrência da hemólise juntamente com a vaso-oclusão principalmente na microvasculatura (Conran et al., 2009; Gemel et al., 2022; Lizarralde-Iragorri & Shet, 2020).

Embora as complicações clínicas desses pacientes sejam amplas e diversas (Figura 2), existem subfenótipos sobrepostos e conhecidos da AF. O subfenótipo onde o indivíduo cursa com níveis elevados de hemoglobina e viscosidade sanguínea está associado ao aumento da ocorrência da síndrome torácica aguda (STA) e episódios vaso-oclusivos. Em contra partida, o subfenótipo hiperhemolítico está associado com aumento de complicações vasculares, como priapismo, úlcera de perna e hipertensão pulmonar. (Azbell & Desai, n.d.)

Dentre as inúmeras manifestações que podem ser observadas, as crises agudas de dor merecem um destaque especial por serem a principal causa de internamento de pacientes com AF (Novelli & Gladwin, 2016). Podem iniciar desde os 6 meses de vida e são desencadeadas por eventos vasooclusivos que acometem a microvasculatura levando a isquemia tecidual e provocando respostas inflamatórias e crises dolorosas que podem variar de intensidade leve ou grave necessitando de internamento e uso de opioides (Ballas, 2018; Y. Wang et al., 2022; Williams & Thein, 2018).

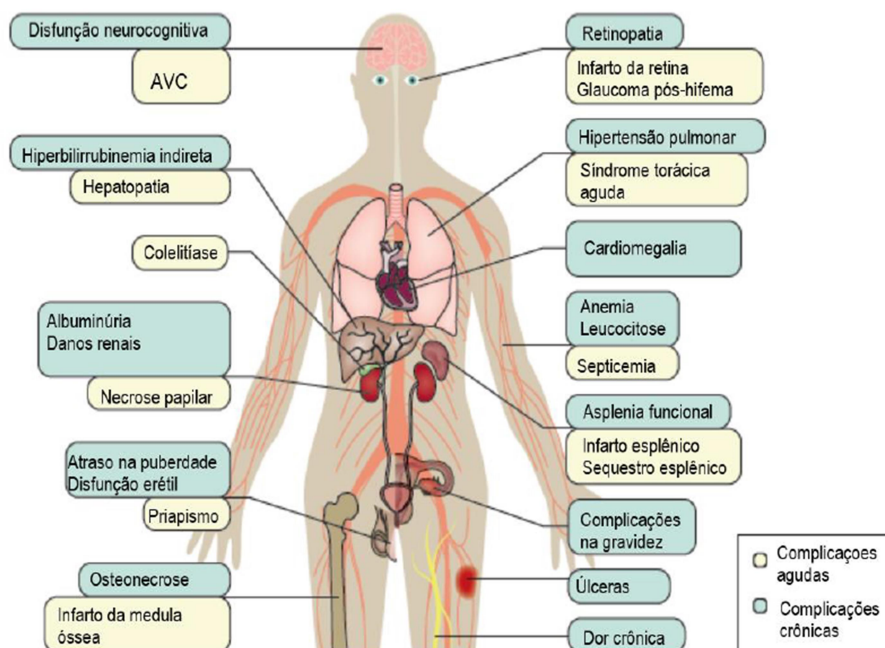


Figura 2: Complicações clínicas da doença falciforme. As complicações agudas levam o paciente ao atendimento médico imediato; a dor é a complicação aguda mais comum. As complicações da gravidez incluem pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intrauterino, parto prematuro e mortalidade perinatal. Adaptado de (Kato et al., 2018).

2.2 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

2.2.1 Acidente vascular cerebral e a anemia falciforme

Os eventos cerebrovasculares constituem uma importante complicação clínica da AF por possuírem graves consequências na qualidade de vida do paciente, constituindo a causa mais relevante de distúrbios neurocognitivos, aumento da morbidade entre pacientes jovens e impactando socioeconomicamente diversas famílias. Estima-se que as crianças com AF quando comparadas a crianças sem a HbS, possuem um risco 300 vezes maior de serem acometidas pelo AVC na forma de infartos cerebrais silenciosos, ataques isquêmicos transitórios, isquêmicos evidentes ou hemorrágicos. (Aggeli et al., 2021; Talha et al., 2022)

A disfunção endotelial e as anormalidades da coagulação são os principais mecanismos patogênicos para a ocorrência do AVC em pacientes com AF. A hemólise sofrida pelos eritrócitos falciformes libera no meio intravascular a

hemoglobina livre e o grupamento heme, promovendo estresse oxidativo, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO). Além disso, ocorre o aumento da síntese de poliaminas, que facilitam a proliferação celular e remodelação vascular (Ferriero et al., 2019; Khaibullina et al., 2022).

Essa disfunção endotelial resulta em estenose vascular e obstrução que podem levar ao aumento da velocidade do fluxo sanguíneo nas artérias cerebrais. Quando a perfusão total aumenta mais do que mecanismos intrínsecos do sistema nervoso central podem compensar, há comprometimento da função vasodilatadora. Esse cenário leva à redução da oferta de oxigênio em áreas com estenose cerebral, aumento da disfunção dos vasos, falcização dos eritrócitos e hiperviscosidade do sangue, propiciando assim a ocorrência de trombose em artérias cerebrais (Sean E. Rossiter, Madison H. Fletcher, 2021; Wei Liu, Margo MacDonald et al., 2019).

Devido a áreas de estenose e vaso-oclusão, vias de angiogênese recebem estímulo para serem ativadas e vasos colaterais são criados em torno principalmente do Polígono de Willis, dando origem a angiopatia de Moyamoya. Essa vasculopatia pode acontecer em crianças com ou sem AF mas é importante ressaltar que a condição predispõe a AVCs isquêmicos recorrentes devido à hipoperfusão e derrame cerebral (Ferriero et al., 2019; Wei Liu, Margo MacDonald et al., 2019).

A embolização paradoxal é outra causa comum de AVC em pacientes com AF pela predisposição à trombose venosa devido a estado hipercoagulável (Kuikel et al., 2021). Além da ativação das vias intrínsecas e extrínsecas, durante a crise vaso-oclusiva pode haver a ocorrência de necrose na medula óssea com liberação de gorduras e formação de embolos. A embolização de trombos ou gordura pode resultar em isquemia no sistema nervoso central (Aggeli et al., 2021).

A detecção e diagnóstico do AVC em pacientes com AF é semelhante ao diagnóstico da população em geral. Entretanto, os sinais e sintomas clínicos podem ser sutis e principalmente em crianças podem facilmente passar despercebido. Os sintomas podem incluir déficits neurológicos focais, visão ou anormalidades de

linguagem, tonturas, vertigens, convulsões, dor de cabeça ou enxaquecas (Aggeli et al., 2021; Connes et al., 2013).

A tomografia computadorizada é a primeira modalidade de imagem que pode diagnosticar a presença de um acidente vascular cerebral hemorrágico na fase aguda. No entanto, a ressonância magnética é a modalidade preferida para avaliação de AVC isquêmico. A ressonância magnética angiográfica desempenha um papel importante no diagnóstico diferencial da causa do AVC (estenose arterial, trombose venosa, acidente vascular cerebral embólico ou aneurisma arterial). Por último, mas não menos importante, hemograma e perfil eletrolítico, nível de glicose no sangue, hemostasia e perfil trombofílico devem ser obtidos para cada paciente com AF apresentando sinais e sintomas sugestivos de evento cerebrovascular (Aggeli et al., 2021; Connes et al., 2013).

2.2.2 Doppler Transcraniano na detecção do AVC

Em 1998, Adams e cols. propuseram, através do STOP (do inglês, *Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia, STOP trial*), a utilização do Doppler Transcraniano (DTC) como ferramenta de triagem e estratificação clínica para a prevenção primária ao AVC em crianças com AF (HbSS) e S/ β^0 talassemia (Hb S/ β^0), sendo possível a identificação de pacientes com risco elevado para o desenvolvimento desta complicação (Adams et al., 1998).

A ultrassonografia com Doppler transcraniano das artérias cerebrais médias proximais intracranianas e carótidas internas distais é uma ferramenta de triagem eficaz em crianças com AF. A velocidade elevada do fluxo sanguíneo cerebral nesses vasos aumenta o risco de acidente vascular cerebral e pode levar ao início da terapia profilática. É uma ferramenta viável, de baixo custo e indolor sendo bem tolerada por crianças. Possui a sensibilidade semelhante às de uma angiografia cerebral, que, embora considerada teste padrão, é mais caro, apresenta risco de complicações e requer preparo hematológico do paciente (Sabarense et al., 2021; Sean E. Rossiter, Madison H. Fletcher, 2021).

Estenose ou oclusão nas artérias intracranianas são identificadas no DTC pelo aumento do fluxo sanguíneo, resultante do estreitamento dos vasos, uma vez

que a velocidade detectada no exame é diretamente proporcional à velocidade cerebral sanguínea e indiretamente proporcional ao diâmetro do vaso (Kija et al., 2019). O acesso a essas artérias é obtido por meio de um transdutor em uma região craniana de baixa densidade óssea ou em um forame ósseo (Figura 3). As ondas de ultrassom são transmitidas através do crânio e são refletidas por hemácias que atravessam as artérias intracerebrais (Mack & Thompson, 2017).

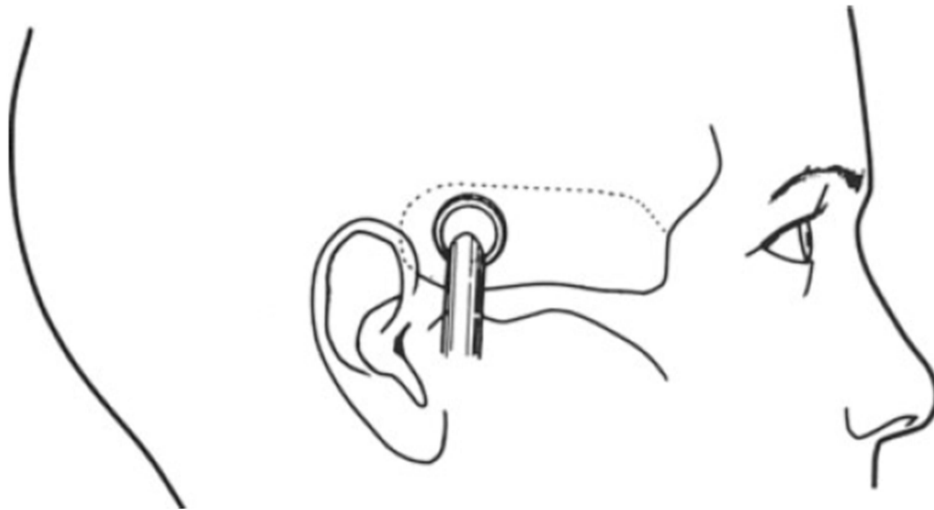


Figura 3: Diagrama da área onde o transdutor do Doppler Transcraniano é posicionado para obter os sinais das artérias intracranianas (Aaslid et al., 1982).

As velocidades obtidas no DTC são estratificadas em 3 grupos: normais (inferiores a 170 cm por segundo); condicional (170 a 199 cm por segundo); ou alto risco (pelo menos 200 cm por segundo) permitindo classificar o risco de cada paciente para desenvolver o AVC e permitindo a aplicação de medidas profiláticas (Estcourt et al., 2020). As medidas de prevenção ao AVC foram drasticamente modificadas pelo STOP (do inglês, *Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia, STOP trial*) e otimizadas pelo STOP II tempos depois. Esses ensaios demonstraram que crianças de 2 a 16 anos com AF e com alto risco para o AVC poderiam ser identificadas no exame de DTC e conduzidas para o início da terapia de transfusão crônica (Figura 4). A adoção dos protocolos do STOP levaram a reduções na taxa de acidente vascular cerebral isquêmico nesses pacientes pediátricos com AF, no estudo realizado por Crow (Crow, 2020; Phillips et al., 2021).

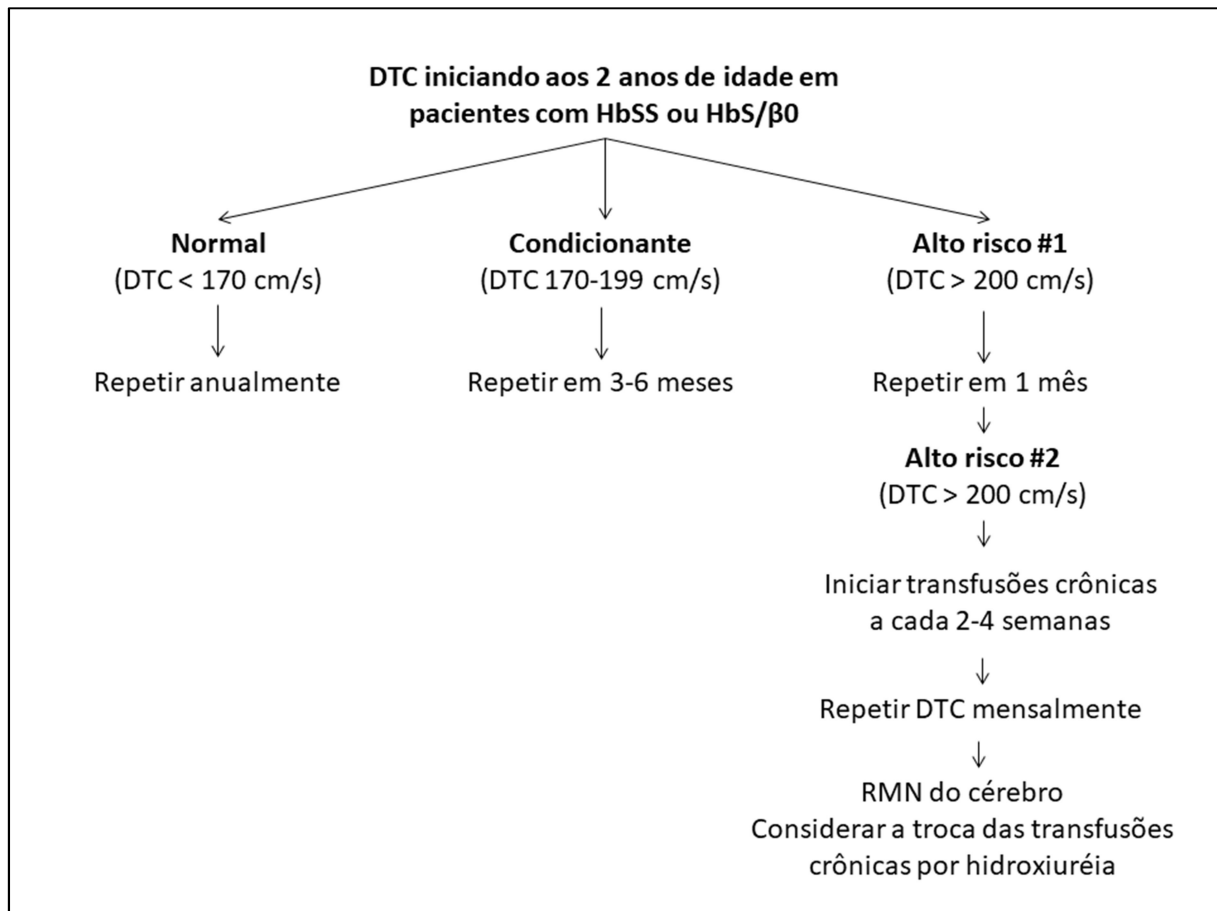


Figura 4: Algoritmo para DTC em pacientes pediátricos com doença falciforme. Adaptado de (Mack & Thompson, 2017).

Apesar de não invasivo e de baixo custo, o DTC apresenta algumas limitações como a alta dependência do operador, a incapacidade de detectar velocidades em todos os pacientes (alguns obtêm resultado inadequado ou não conclusivo), particularmente aqueles com janelas ósseas ruins, baixa especificidade para o AVC e não é capaz de prever uma isquemia “silenciosa” (Wei Liu, Margo MacDonald et al., 2019).

2.3 MEDIDAS DE PREVENÇÃO DO AVC

2.3.1 Terapia transfusional

O ensaio de prevenção contra o acidente vascular cerebral na anemia falciforme (STOP), que foi relatado por Adams et al em 1998, mostrou que o regime regular transfusional de sangue foi uma profilaxia primária eficaz contra o acidente

vascular cerebral em crianças com risco elevado identificadas pelo Doppler transcraniano. (Crow, 2020).

A transfusão crônica é o padrão de cuidado para a prevenção secundária do AVC. Até 90% dos pacientes com AVC podem apresentar recorrência sem intervenção terapêutica, e o risco de AVC secundário diminui para ~20% com terapia transfusional crônica que mantém HbS% < 30% (Zheng et al., 2021). Para reduzir o risco de acidente vascular cerebral, especialmente em crianças com alterações no DTC, a *Sociedade Americana de Hematologia (AHS)* sugere a transfusão sanguínea regular por pelo menos um ano para reduzir os níveis de HbS abaixo de 30% e para manter níveis de Hb >9,0 g/dL juntamente com a avaliação da sobrecarga de ferro (Aggeli et al., 2021; Talha et al., 2022).

A transfusão de hemácias melhora a oferta de oxigênio no sangue ao reduzir a porcentagem de hemoglobina S (HbS%) e viscosidade sanguínea, sendo uma medida terapêutica comum para prevenção e tratamento de complicações agudas e crônicas da AF (Zheng et al., 2021). As transfusões aumentam a concentração de HbA e reduzem a concentração de HbS através da diluição do sangue do paciente pelas hemácias do doador. Como a polimerização é proporcional à concentração da HbS, sua diluição provoca um efeito antagônico às complicações da patologia. A terapia com transfusão também suprime a produção endógena de eritropoetina reduzindo posteriormente a formação de novas hemácias contendo HbS (Azar & Wong, 2017).

O benefício da terapia transfusional crônica (Figura 5) está bem estabelecido na prevenção de acidentes vasculares cerebrais primários e secundários e infartos cerebrais silenciosos recorrentes. Além destas complicações, a transfusão pode corrigir a anemia aguda em crises aplásticas, sequestro esplênico agudo e hepático; reduzir a HbS% na síndrome torácica aguda (STA), acidente vascular cerebral agudo e falência multiorgânica aguda (Darshana et al., 2021; Han et al., 2021; Zheng & Chou, 2021).

A transfusão simples crônica inevitavelmente leva à sobrecarga de ferro e, portanto, o início da terapia de quelação de ferro é recomendada. O ferro livre se acumula no fígado, coração e sistema endócrino, resultando em disfunção desses órgãos. Uma vez que a inflamação associada à DF promove a retenção de ferro no

sistema reticuloendotelial, o fígado é o órgão mais comumente afetado. A quelação de ferro é essencial em pacientes que necessitam dessa terapia transfusional a fim de evitar complicações adicionais associadas ao seu excesso (Mack & Thompson, 2017; Zheng & Chou, 2021).

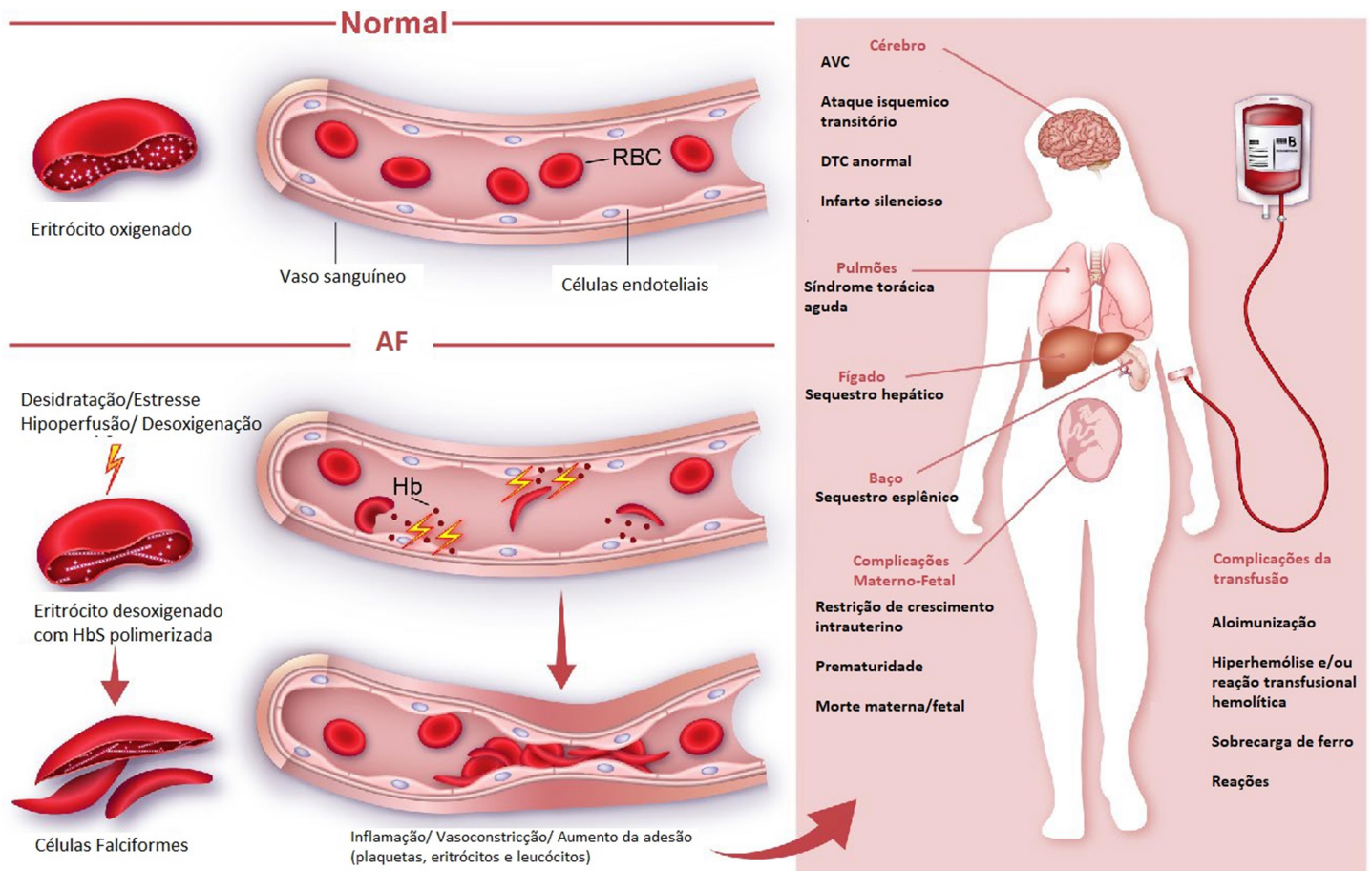


Figura 5: Indicações para transfusão de hemácias na AF. Adaptado de (Han et al., 2021)

A aloimunização, ou formação de anticorpos contra antígenos “não-próprios” é um dos principais efeitos adversos da transfusão. Essa aloimunização aumenta o risco de reações transfusionais hemolíticas e leva a demora na identificação de unidades de hemácias compatíveis fenotipadas. Um estudo multicêntrico identificou uma prevalência de aloimunização de 2-5% na população geral, contra 5-75% de prevalência em pacientes com AF. A fisiopatologia da aloimunização na AF é complexa e está associada ao nível de correspondência de antígeno, diversidade do sistema de grupos sanguíneos Rh e fatores imunológicos (Linder & Chou, 2021).

Na prática, a compatibilidade sorológica para antígenos do grupo sanguíneo ABO, antígenos Rh e os antígenos K não previnem totalmente a aloimunização

devido à existência de alelos Rh com expressão reduzida ou alterada. A ampliação, e até mesmo a genotipagem molecular, de antígenos do grupo sanguíneo é uma alternativa eficaz para a diminuição das taxas de aloimunização (Ware et al., 2017). Os aloanticorpos comumente identificados em pacientes com DF incluem anticorpos contra Rh (D, C/c, E/e), Kell, Duffy (Fya, Fyb), Kidd (Jka, Jkb) e S, em parte devido à expressão discrepante do antígeno em pacientes de etnia principalmente africana em comparação com a maioria dos doadores com origem europeia nos EUA. Para evitar aloimunização, recomenda-se a compatibilidade profilática de antígeno com Rh (C, E ou C/c, E/e) e hemácias compatíveis com Kell (Zheng et al., 2021).

Infecções virais transmitidas por transfusões também fazem parte dos fatores de risco que pacientes submetidos a terapia de hipertransfusão estão expostos. Apesar da redução das transmissões como resultado do uso de testes de triagem, a transmissão da hepatite B e da hepatite C, bem como do HIV, ainda ocorre com frequência em localidades com recursos baixos, onde a triagem sistemática não é universal (Linder & Chou, 2021; Ware et al., 2017).

2.3.2 Terapia com Hidroxiuréia

A hidroxiuréia (HU), uma droga citotóxica, foi aprovada pela U.S. *Food and Drug* para o tratamento de adultos com AF desde 1998 e tem sido associado a uma melhor sobrevida tanto para adultos como para crianças com anemia falciforme (Sales et al., 2022). Em pacientes com DTC condicionante e seguindo protocolo interno do HEMOPE, a HU é administrada em dose inicial (5mg/Kg/dia) até a dose máxima tolerada (15mg/Kg/dia) de acordo com a resposta de paciente ao medicamento e seguindo os critérios de conduta propostos pelo Ministério da Saúde (BRASIL., 2015). A Sociedade Americana de Hematologia estabeleceu diretrizes que sugerem terapia de HU com pelo menos 20 mg/kg/dia em dose fixa ou a dose máxima tolerada (M. R. DeBaun et al., 2020).

Foi demonstrado através do estudo TWiTCH (*do inglês, TCD With Transfusions Change to Hydroxyurea, TWiTCH*) que a hidroxiuréia pode substituir com eficácia a terapia de transfusão crônica para crianças com AF de 2-16 anos com alto risco no DTC que foram transfundidas há pelo menos um ano e sem

evidência de vasculopatia cerebral demonstrada pela RMN (Aggeli et al., 2021). Além disso, as diretrizes da Sociedade Americana de Hematologia sugerem terapia com a hidroxiuréia para crianças com AF (idades de 2 a 16 anos) que vivem em áreas de renda média baixa, onde transfusões de sangue regulares e terapias de quelação não são disponíveis ou acessíveis (Talha et al., 2022). A eficácia e a segurança de uso da HU também foi demonstrada em lactentes e crianças pequenas, por meio do estudo BABY HUG (*do inglês Pediatric Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia, BABY HUG trial*), um estudo multicêntrico randomizado de fase III, realizado com 213 lactentes com idade entre 9 e 18 meses (Kamat & Thomas, 2012).

Evidências sugerem que o uso de HU reduz a incidência de dor aguda, a taxa de síndrome torácica aguda, a frequência de transfusão de sangue e a mortalidade entre pacientes com AF. Além disso, a hidroxiuréia diminui o número de plaquetas e leucócitos reduzindo os efeitos nocivos por elas nas lesões vasculares. (Azbell & Desai, n.d.; Darshana et al., 2021).

A eficácia clínica desse medicamento está relacionada com a indução da produção de HbF, diminuindo a concentração da HbS. Além disso, a hidroxiuréia mata seletivamente as células da medula óssea e aumenta o número de eritroblastos produzindo HbF, que inibe a polimerização intracelular da HbS e previne a falcização nos eritrócitos. Os glóbulos vermelhos com níveis mais altos de HbF têm sobrevida mais longa, atenuando assim a hemólise. A HU é capaz ainda de aumentar os níveis de hemoglobina; reduz a contagem de neutrófilos, monócitos e reticulócitos e altera a expressão de moléculas de adesão no endotélio e geração de óxido nítrico. Essas alterações hematológicas diminuem o risco de vaso-oclusão em pacientes com AF (Rigano et al., 2018; Sales et al., 2022).

2.4 MODULADORES GENÉTICOS

Embora a técnica do DTC se mostre muito útil na estratificação do risco para o AVC, como dito anteriormente, ela possui algumas limitações intrínsecas, dificultando essa estratificação em alguns pacientes. Por isso, vem à tona a necessidade do estabelecimento de um painel mais sensível de marcadores

genéticos que se relacionem ao risco do desenvolvimento de AVC nos pacientes com AF, para que sejam utilizados como ferramenta de suporte aos resultados do DTC (Belisário et al., 2015; Flanagan et al., 2013).

Sem a prevenção primária, aproximadamente 11% dos pacientes com AF, terá um AVC até os 20 anos, e 24% terá um AVC até os 45 anos. Sem a prevenção secundária, aproximadamente 67% daqueles que já tiverem um AVC inicial terão um segundo AVC. A alta incidência dessa grave complicação e a necessidade de terapias preventivas, trazem à tona a importância de novos estudos sobre possíveis marcadores que auxiliem na elucidação da fisiopatologia multifatorial para que novas medidas profiláticas possam beneficiar os pacientes (Ghafuri et al., 2022; Sean E. Rossiter, Madison H. Fletcher, 2021).

Alguns moduladores genéticos já são bem conhecidos na anemia falciforme que apesar de ser uma patologia monogênica, suas complicações sofrem influência da atividade de outros genes, refletindo em uma notável heterogeneidade fenotípica na clínica dos pacientes (Rampersaud et al., 2021). Um desses moduladores genéticos é a coexistência com alfa talassemia (α -talassemia), a qual tem sido associada com uma menor taxa hemolítica, diminuição da contagem de reticulócitos, níveis mais baixos de LDH e menor taxa de AVC (Fertrin & Costa, 2010; Wonkam et al., 2015). Além disso, ocorre redução da HbS e diminuição da polimerização, amenizando os eventos vaso-oclusivos, levando a um efeito protetor contra complicações clínicas como o AVC (Rumaney et al., 2014).

Os cinco haplótipos clássicos do gene *HBB* já descritos contribuem para a variabilidade fenotípica da AF através de seus efeitos sobre os níveis de hemoglobina fetal (Darshana et al., 2021). Os haplótipos da globina β^S , que são padrões de sítios polimórficos ligados ao cluster da β -globina e a concentração da HbF, também são moduladores genéticos já estabelecidos e estão relacionados com a evolução clínica de pacientes com AF (Ezekekwa et al., 2018). Pacientes que apresentam haplótipo Bantu/República Central Africana (CAR) tendem a desenvolver um quadro clínico mais grave, pois cursam com níveis diminuídos de HbF, enquanto que o haplótipo Senegal (SEN) ou Árabe-Indiano (ARB) apresentam maiores níveis de HbF, tendendo a apresentar uma forma clínica menos grave da

doença. Por fim, pacientes que possuem o haplótipo Benin (BEN) apresentam quadros clínicos intermediários (Serjeant & Vichinsky, 2018; Steinberg, 2020).

No entanto, as diferenças nos haplótipos β^S não são suficientes para explicar a diversidade clínica da AF dentro das mesmas regiões ou entre regiões diferentes. A compreensão desses diferentes fenótipos da AF merece atenção através da expansão dos estudos genéticos, incluindo estudos focados em *locis* que estão ligados ao acidente vascular cerebral e outras complicações graves, para implementação de melhorias no atendimento aos pacientes (Ezekekwa et al., 2018; Wonkam et al., 2015).

2.5 CAVEOLINA

2.5.1 O óxido nítrico na anemia falciforme

Antes de nos adentrarmos no estudo da proteína caveolina-1 é importante ressaltarmos a importância da enzima eNOS que está intimamente relacionada com a fisiopatologia da AF (Antwi-Boasiako & Campbell, 2018) bem como a funções da proteína expressa pelo gene *CAV-1* (Pushpakumar et al., 2019).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa de radical livre, diatômica. É muito solúvel em água e cerca de 7 vezes mais solúvel em solventes não polares e membranas lipídicas biológicas, de modo que pode atravessar facilmente as membranas fosfolipídicas (Pakula, 2019). O NO é produzido a partir da arginina por sintases de óxido nítrico (NOS) que convertem enzimaticamente a L-arginina em L-citrulina. Possuimos três isoformas da enzima NOS: NO sintase neuronal (NOS1), NOS induzível por macrófagos (NOS2) e NOS endotelial (NOS3), sendo esta última isoforma a mais abundante em nosso organismo (Antwi-Boasiako et al., 2018; Doulias & Tenopoulou, 2020).

O NO produzido pela NO sintase endotelial (também chamada de eNOS) é um forte modulador da fisiologia vascular. Através de seus efeitos sobre as células lisas vasculares, o NO desempenha um papel fundamental na vasodilatação. Além disso, o NO demonstrou reduzir a transcrição de várias moléculas de adesão endotelial como ICAM-1 e VCAM-1 além de famílias da selectina (E- e P-selectina) e para inibir

a ativação plaquetária (Antwi-Boasiako et al., 2018; Nader, Romana, & Connes, 2020).

A falcização e hemólise eritrocitária causadas pela polimerização da HbS resultam na liberação de hemoglobina livre que elimina rápida e potently o NO do plasma, reduzindo a sua biodisponibilidade. A hemólise também resulta na liberação de arginase, uma enzima que degrada o substrato para a síntese de NO, L-arginina, diminuindo assim a produção de NO pela eNOS. (Antwi-Boasiako & Campbell, 2018; Hallmark et al., 2021) Além disso, os pacientes com AF demonstraram ter elevações de dimetilarginina assimétrica (ADMA), um metabólito da arginina e inibidor endógeno da eNOS, implicando no aumento da inibição dessa enzima e diminuindo ainda mais a produção de NO (Hallmark et al., 2021).

A “hipótese da deficiência de NO” postula que vários eventos desencadeados pela hemólise resultam em diminuição da biodisponibilidade de NO na AF. Por sua vez, essa diminuição levaria a vasoconstrição, lesão endotelial, geração de espécies reativas de oxigênio, ativação plaquetária, adesão de leucócitos, vaso-oclusão e isquemia. Assim, a baixa biodisponibilidade de NO contribui para a patologia da AF no desenvolvimento de complicações clínicas participando de mecanismos da oclusão vascular que pode levar a morbidade e mortalidade substanciais (Nader, Romana, & Connes, 2020; Nader, Romana, Guillot, et al., 2020).

Estudos de disponibilidade de NO e sua sinalização são repletos de desafios relacionados à sua mensuração devido à própria meia-vida curta (média de meia-vida de 100 ms) e a complexidade do seu metabolismo. Portanto, os desafios associados com a medição de NO não devem ser subestimados e precisam ser considerados ao interpretar os estudos de sua biodisponibilidade (Hallmark et al., 2021).

2.5.2 Gene CAV-1 e a função da sua proteína

Os principais candidatos para a avaliação da predisposição do AVC em pacientes falciformes incluem genes envolvidos na biologia do óxido nítrico, lesão endotelial, trombose e inflamação (Driss et al., 2009; Hoppe et al., 2007). Neste contexto, um interessante candidato é o gene *CAV-1* localizado no cromossomo 7

(7q31.1) e responsável por codificar a caveolina-1, um componente estrutural e de sinalização das caveolas, principalmente em células inflamatórias, epiteliais e endoteliais (Jia et al., 2020; Yan et al., 2019).

As caveolas são caracterizadas como invaginações de 50 a 100 nm da membrana plasmática na superfície celular, formadas principalmente por caveolinas e são encontradas em tipos celulares diferenciados, incluindo principalmente células endoteliais e células musculares lisas vasculares. Existem três isoformas de caveolinas, que são denominadas caveolina 1 (Cav1), caveolina 2 (Cav2) e caveolina 3 (Cav3). Essas proteínas são codificadas por diferentes genes, *CAV1*, *CAV2* e *CAV3*, respectivamente. *CAV1* é expresso na maior parte dos tipos celulares e é essencial para a biogênese das cavéolas; *CAV3* é predominantemente expresso em células musculares (células cardíacas, esqueléticas estriadas e células musculares lisas) sendo também necessária para a morfogênese caveolar; *CAV2* é geralmente expresso em conjunto com Cav1 em adipócitos, células endoteliais, pneumócitos e fibroblastos, mas parece ser dispensável para a formação caveolar. A perda da expressão dos genes *CAV1* ou *CAV3* resulta em uma completa falta de caveolas (Lian et al., 2019; Mollace et al., 2020).

Caveolinas podem se ligar a moléculas pró-sobrevivência e pró-crescimento, como a enzima eNOS e outras proteínas que permitem que a caveolina regule vias de sinalização, como receptor acoplado à proteína G, tirosina quinases, eNOS e vias MAPK, que estão associados à inflamação e alterações fenotípicas na parede vascular e no miocárdio. Consequentemente, foi estabelecido que a caveolina desempenha um papel crucial em doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose, disfunção da microcirculação coronariana, cardiomiopatia, insuficiência cardíaca, lesão de reperfusão isquêmica, hipertensão pulmonar e acidente vascular cerebral isquêmico (Lian et al., 2019; Tian et al., 2020).

A maior parte quantitativa e funcional da enzima eNOS é encontrada nas caveólas, e possuem atividade enzimática não detectável em frações de membrana plasmática onde essas importantes invaginações são inexistentes. A proteína Cav-1 é um componente estrutural essencial na formação dessas cavéolas e está envolvida em diferentes vias de transdução de sinal (Troiano et al., 2021).

A Caveolina-1 (Cav-1), uma proteína transmembrana integral de 21 kDa é um regulador negativo bem conhecido da atividade da eNOS em células endoteliais vasculares, interagindo diretamente com a enzima produtora do NO e mantendo-a em um estado inativo (Hsieh et al., 2020). A eNOS é uma enzima dependente de Ca^{2+} /calmodulina e sua atividade é regulada por sua interação com caveolina. Quando a eNOS está ligada à caveolina-1, a atividade da enzima é atenuada enquanto sua dissociação da caveolina-1 aumenta a função da enzima (Mollace et al., 2020; Pushpakumar et al., 2019). Quando a concentração de cálcio intracelular é aumentada, as proteínas (Cav-1/eNOS) se dissociam, ativando produção do NO, importante vasodilatador, como ilustrado na figura 6 (Mierke et al., 2020).

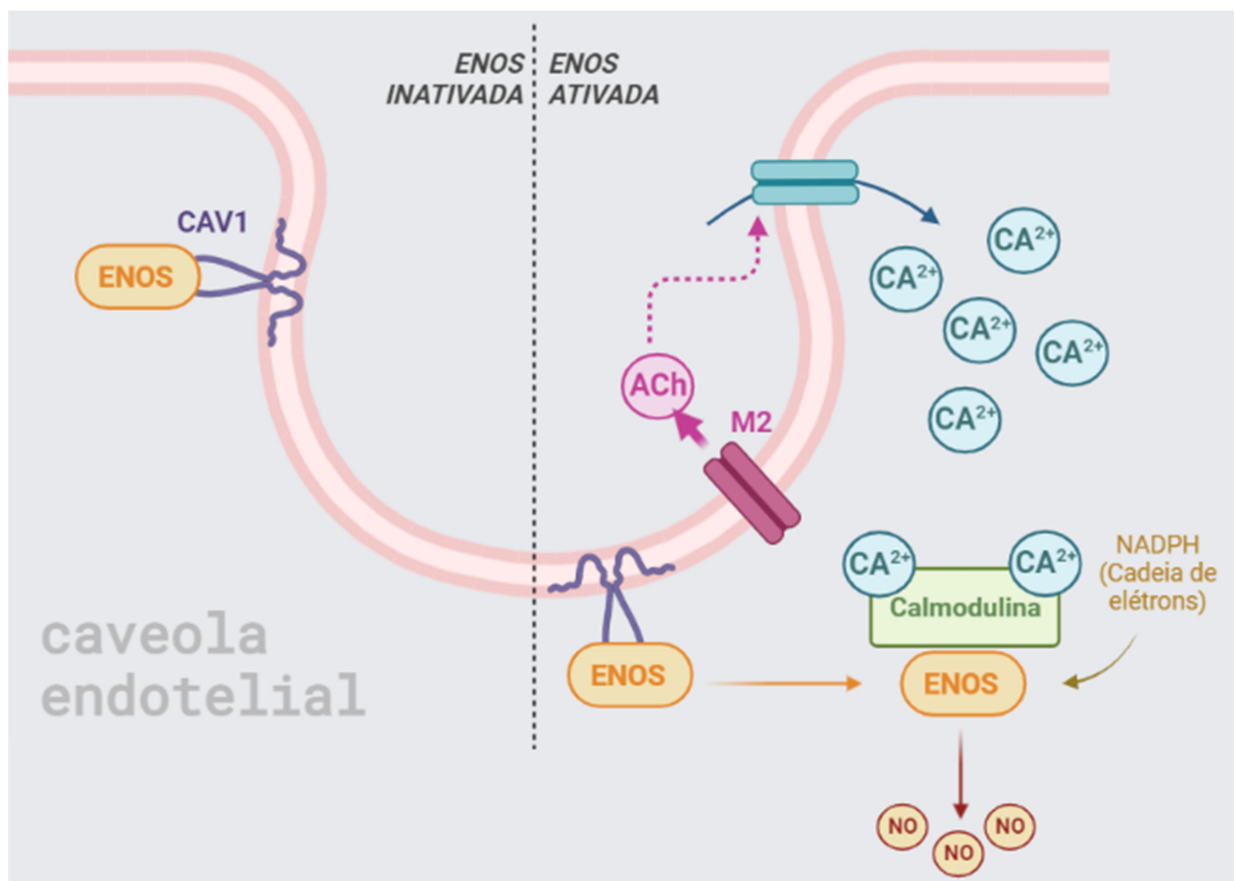


Figura 6: Esquema de ativação da eNOS em caveolas endoteliais. Modificado de (Lian et al., 2019). A eNOS inativada permanece ligada a caveolina-1, com fluxo de elétrons vindos do NADPH interrompido. Com a ativação do receptor muscarínico M2 pela acetil-colina, ocorre o influxo de cálcio que se liga com a calmodulina. A eNOS se dissocia da caveolina-1 e se combina com a calmodulina, reestabelecendo a cadeia de elétrons vindo do NADPH produzindo o NO. NO, óxido nítrico; eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; ACh, acetilcolina; M2, receptor muscarínico 2.

Alterações biológicas no ciclo do NO na AF parecem estar envolvidas no desenvolvimento de doenças cerebrovasculares, como a vasculopatia cerebral, infarto silencioso e acidente vascular isquêmico (Connes et al., 2013; Michael R. DeBaun et al., 2012).

Outra importante função de caveolina-1 de grande impacto na fisiologia vascular é seu envolvimento na progressão da aterosclerose através da regulação da inflamação vascular e transcitose de LDL (*do inglês low-density lipoprotein*) (X. Zhang et al., 2020). A caveolina também está envolvida em diversos estudos a respeito da sua funcionalidade relacionada ao AVC isquêmico, o mais comum na AF, sendo apontada como uma importante proteína por desempenhar funções como alteração da permeabilidade da barreira hematoencefálica, regulação da inflamação vascular cerebral, angiogênese cerebral, estresse oxidativo e até a sinalização neuronal, podendo ser uma importante molécula de valor prognóstico (Castellanos et al., 2018; Huang et al., 2018; Jun Zhang et al., 2016; Zhong et al., 2019).

Os processos críticos durante o desenvolvimento do AVC como a alteração da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), angiogênese, neuroinflamação e pré-condicionamento isquêmico são modulados pela caveolina-1. As vias MAPK e fosfoinositide 3-quinase/proteína quinase B (PI3k/Akt), que medeiam apoptose e autofagia, também são afetadas pela Cav-1 no contexto de lesão de isquemia e reperfusão. Tomados em conjunto, a permeabilidade da BHE, a sobrevivência celular, a inflamação e a angiogênese estão envolvidas na regulação do acidente vascular cerebral isquêmico pela caveolina (Tian et al., 2020).

2.5.3 Polimorfismos no gene CAV-1

Alguns polimorfismos no gene CAV-1 já foram associados com consequências funcionais para o gene da caveolina 1 e podem estar associados a desfechos clínicos. Foram selecionados para este trabalho três SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) no gene CAV-1: rs3807989 (G>A), rs7804372 (T>A) e rs1997623(A>C), todos com o MAF (frequência alélica mínima) maior que 0,1 nas populações africana e caucasiana. O SNP rs3807989 está localizado no cromossomo 7q31 no segundo íntron do gene CAV1, sendo considerado um Tag-

SNP que está significativamente associado com os níveis de expressão da proteína caveolina-1 (S. Chen et al., 2016; Kastelijn et al., 2011; Jian Zhang et al., 2017).

O SNP rs7804372 também é intrônico assim como o rs3807989. Apesar de suas localizações intrônicas não resultarem diretamente em uma alteração de aminoácidos da cadeia transcrita, influenciam os níveis de expressão do gene *CAV1* por *splicing* alternativo, afetando a estabilidade do mRNA ou ainda se combinando a outros SNPs próximos (Li et al., 2020a). Além disso, o rs7804372 pode estar relacionado com o controle transcricional por se localizar em um sítio de ligação para o fator de transcrição PBX1 (do inglês *pre-B-cell leukemia homeobox-1*) (Sugie et al., 2013).

Segundo o banco de dados genéticos *Ensembl*, o rs3807989 está localizado na posição 7:116546187 (*forward strand*) do genoma. Com relação a posição do SNP no transcrito, ele se encontra na posição 12759 considerando o intron no sentido 3'-5'. Já para o rs7804372, temos como posição do genoma e posição no transcrito (no sentido 3' – 5') 7:116554174 (*forward strand*) e 4772, respectivamente. Os dois SNPs estão envolvidos no principal transcrito do gene *CAV1* (ENST00000341049.7) com tamanho de 36.143bp, como ilustrado na **tabela 1**.

Já o SNP selecionado rs1997623, é uma variante missense que faz parte do transcrito do éxon 1 e já foi relacionado anteriormente com a síndrome metabólica. Estudos têm especulado que a variante pode influenciar o nível de expressão de gene *CAV1* por meio da influencia em mecanismos regulatórios na região promotora (Nizam et al., 2018). De acordo com o *Ensembl*, esse SNP está envolvido em um transcrito menor quando comparado ao transcrito dos SNPs intrônicos, apresentando 34.628bp (ENST00000451122.5). Quanto a sua posição genômica e no transcrito temos 7:116525306 (*forward strand*) e ENST00000451122.5:c.244, respectivamente (**Tabela 1**).

	Principal transcrito	Posição no genoma	Posição no transcrito
rs3807989	ENST0000034104 9.7	Cromossomo 7:116546187 (forward strand)	ENST00000341049.7:c.196- 12759 G>A
rs7804372	ENST0000034104 9.7	Cromossomo 7:116554174 (forward strand)	ENST00000341049.7:c.196- 4772 T>A
rs1997623	ENST0000045112 2.5	Cromossomo 7:116525306 (forward strand)	ENST00000451122.5:c. 244 A >C

Tabela 1: Principais transcritos, posição genômica e no transcrito para cada SNP, segundo o banco de dados *Ensembl*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a associação dos polimorfismos rs3807989, rs7804372 e rs1997623 no gene *CAV-1* com complicações cerebrovasculares de pacientes pediátricos com anemia falciforme acompanhados pelo ambulatório do Programa de Triagem Neonatal da Fundação HEMOPE.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs rs3807989, rs7804372 e rs1997623 no gene *CAV-1*.
- Verificar a existência de associação entre os SNPs rs3807989, rs7804372 e rs1997623 no gene *CAV-1* e o desenvolvimento de complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com AF;

4. METODOLOGIA

4.1 Casuística

Este trabalho trata-se de um estudo do tipo coorte retrospectivo com comparação interna de grupos, onde os pacientes foram classificados de acordo com as manifestações clínicas. Incluiu-se também o resultado do Doppler Transcraniano, apresentado durante o seguimento no HEMOPE juntamente com o resultado da genotipagem para os polimorfismos selecionados. O trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Pernambuco, onde foram realizados os testes moleculares e tivemos a Fundação de Hematologia de Pernambuco como instituição coparticipante, onde amostras foram coletadas e realizadas as análises dos prontuários dos pacientes participantes.

A amostra foi constituída de 339 pacientes pediátricos portadores de anemia falciforme (Hb SS), cadastrados e acompanhados no ambulatório do Programa de Triagem Neonatal da Fundação HEMOPE. De todos os pacientes foram analisados os perfis clínicos e laboratoriais contidos em seus prontuários de acompanhamento médico. Durante as visitas de rotina desses pacientes ao ambulatório do HEMOPE, cerca de 8ml de sangue periférico foram coletados em tubo contendo EDTA como anticoagulante e conduzido ao setor de Hematologia e Biologia Molecular do Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco para a realização das análises moleculares.

De acordo com as complicações clínicas os pacientes foram alocados nos seguintes grupos:

1. Subgrupo de indivíduos que desenvolveram AVC: composto por indivíduos que apresentaram registro de ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada comprovando a lesão neurológica;
2. Subgrupo de indivíduos que apresentaram os resultados de DTC: normal (pacientes com média da velocidade máxima de fluxo sanguíneo < 170 cm/s), condicionante (pacientes com média da velocidade máxima de fluxo sanguíneo entre $170 - 199$ cm/s) e alto risco (pacientes com média da velocidade máxima de fluxo sanguíneo ≥ 200 cm/s);
3. Subgrupo de indivíduos com doença cerebrovascular (DCV): pacientes que possuem o acometimento pelo AVC e DTC classificado como alto risco.

4. Subgrupo de indivíduos com outras complicações cerebrovasculares: pacientes com infarto silencioso (presença de RNM alterada sem manifestações clínicas) e/ou ataque isquêmico transitório (isquemia de rápida reperfusão).

4.2 Critérios de inclusão

Foram incluídos na pesquisa pacientes pediátricos de 02 até 20 anos de idade (seguindo o critério de idade estabelecido pela Organização Mundial da Saúde), com anemia falciforme confirmados por biologia molecular, de ambos os sexos e que comparecem regularmente ao ambulatório do Programa de Triagem Neonatal da Fundação HEMOPE, onde seus dados são atualizados a cada visita de rotina.

4.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos da pesquisa pacientes aparentados, pacientes que estejam em regime profilático de hipertransfusão e/ou em uso de hidroxiuréia ou ainda que tenham realizado os referidos tratamentos em menos de 3 meses antes da coleta.

4.4 Análise hematológica e clínica

As análises dos dados hematológicos foram realizadas utilizando contador eletrônico de células (STKS, Coulter Corporation, FL, USA). A quantificação das hemoglobinas fetal (HbF) e S foram feitas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC – VARIANT / BIO-RAD, CA, USA). Os dados clínicos foram obtidos pela análise de prontuários dos pacientes que comparecem regularmente ao ambulatório de Hematologia da Fundação HEMOPE.

4.5 Análise molecular

4.5.1 Extração do DNA genômico e genotipagem

A extração de DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos pela técnica de fenol-clorofórmio modificado (Davis et al., 1986). Os SNPs: rs3807989, rs7804372 e rs1997623, localizados no gene *CAV-1* selecionados para esse estudo, possuem MAF (*do inglês, minor allele frequency*) superior a 10% na população africana (YRI) e caucasiana (CEU). A metodologia empregada para a realização das genotipagens foi a técnica de PCR em tempo real através da detecção de SNPs

utilizando o sistema TaqMan®. As reações foram feitas utilizando o aparelho *QuantStudio® 5 Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, EUA).

4.6 Análise Estatística

As características clínico-laboratoriais dos indivíduos foram apresentadas de forma descritiva. As frequências genotípicas e alélicas foram calculadas por contagem direta. Para verificar se as frequências estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado o teste de distribuição de χ^2 . O teste χ^2 ou teste exato de Fisher's (quando aplicável) foi utilizado para comparações entre variáveis categóricas, enquanto que os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para comparações entre as variáveis contínuas. O risco para o desenvolvimento das complicações foi avaliado a partir da análise das datas de desenvolvimento das complicações, em relação à data de nascimento. Curvas de incidência cumulativa foram construídas refletindo o tempo para o desenvolvimento das complicações com o teste de log-rank utilizado para a comparação das curvas. Todos os valores de P foram ajustados para os dois lados com nível de significância a 0,05. O modelo univariado e multivariado de riscos proporcionais de Cox (CPHM) foi realizado com o AVC como evento para testar a independência de covariáveis. Todas as análises foram realizadas utilizando os softwares SPSS Statistics 19.0 (IBM corporation) e STATA 16.0 (Stata Corporation, EUA).

4.7 Aspectos Éticos

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP/CCS/UFPE) e ao comitê de ética do HEMOPE. Após a aprovação (CAAE: 48566421.3.3001.5195), foi desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). A coleta de dados só foi iniciada após a aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP cumprindo o cronograma proposto.

5. RESULTADOS

5.1 Descrição da coorte

Foram incluídos no estudo 339 indivíduos com acompanhamento regular no HEMOPE, sendo 165 do sexo feminino (48,7%) e 174 do sexo masculino (51,3%). A mediana de idade dos 339 pacientes foi de 14 anos (intervalo de 2 – 20 anos). A taxa de ocorrência de AVC no grupo analisado foi de 7,4% (25 pacientes) com mediana de idade de 06 anos (intervalo de 2 - 12 anos). A taxa de ocorrência de doença cerebrovascular foi de 14,2% (48 pacientes) com mediana de idade de 06 anos (intervalo de 2 – 12 anos). Com relação às análises do DTC, nove pacientes apresentaram DTC inadequado (isto é, velocidade de fluxo não detectada pelo exame devido à limitação técnica), um que apresentou o exame inconclusivo (isto é, resultados de DTC que não puderam ser interpretados) e outros nove que nunca realizaram o DTC. Devido a esses fatos, esses 19 pacientes foram excluídos das análises de associação com o exame de DTC. Em relação aos resultados da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral avaliado pelo DTC, 213 (66,6%) pacientes foram classificados como DTC normal, 73 (22,8%) como DTC condicionante e 34 (10,6%) como DTC de alto risco. Os dados da caracterização laboratorial e da caracterização clínica dos pacientes incluídos no estudo constam na tabela 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2: Caracterização laboratorial dos pacientes incluídos no estudo.

Variável Laboratorial	Mediana	Intervalos
HbF (%)	9,60	1,10 – 27,90
Contagem de hemácias ($\times 10^{12}$ células/ μ L)	2,62	1,64 – 4,98
Hemoglobina (g/dL)	7,65	4,80 – 11,60
Hematócrito (%)	22,75	14,70 – 33,20
Volume corpuscular médio (fL)	86,90	53,40 – 103,40
Hemoglobina corpuscular média (g/dL)	29,30	19,80 – 85,70
Contagem de leucócitos ($\times 10^3$ /L)	14,68	2,10 – 489,00
Contagem de reticulócitos (%)	10,4	1,50 – 29,20
Contagem de plaquetas ($\times 10^3$ /L)	454	49,00 – 1010,00
Lactato desidrogenase (U/L)	824	12,40 – 2401,00
Bilirrubina total (mg/dL)	1,94	0,38 – 39,00
Bilirrubina indireta (mg/dL)	1,51	0,24 – 11,00

Tabela 3: Caracterização clínica dos pacientes incluídos no estudo.

Caracterização clínica dos pacientes incluídos no estudo	N (%) N = 339
Sexo	
Feminino	165 (48,70%)
Masculino	174 (51,30%)
Idade	
Intervalo (anos)	5 - 20
Mediana (anos)	14
Doppler Transcraniano	320
Normal	213 (66,6%)
Condicionante	73 (22,8%)
Alto risco	34 (10,6%)
AVC	339
Sim	25 (7,4%)
Não	314 (92,6%)
Doença Cerebrovascular	339
Sim	48 (14,2%)
Não	291 (85,8%)
Outras complicações Cerebrovasculares	322
Sim	22 (6,6%)
Não	310 (93,4%)
FRAVC	339
Sim	34 (10%)
Não	305 (90%)

Dos 48 pacientes classificados no grupo DCV, 25 (52,01%) desenvolveram AVC. As taxas de ocorrência do AVC de acordo com os grupos do DTC foram: 7/213 (3,28%) para os indivíduos com DTC normal, 4/73 (5,47%) para os indivíduos com DTC condicionante e no grupo de alto risco 11/34 (32,35%).

Com relação aos haplótipos da globina β^s , 152 pacientes (58,8% de um total de 259 pacientes que possuem o resultado da análise) apresentaram o haplótipo CAR/CAR.

5.2 Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos do gene CAV1

As genotipagens dos SNPs rs3807989, rs7804372 e rs1997623 localizados no gene CAV-1 foram realizadas em 339 indivíduos. A distribuição genotípica dos SNPs apresentou-se dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). As frequências alélicas e genotípicas dos referidos polimorfismos podem ser observadas na tabela 4.

Tabela 4: Frequências alélicas e genotípicas.

SNPs do gene <i>CAV-1</i>	Genótipos	Frequências genotípicas (n e %)	Alelos	Frequências alélicas (%)
rs7804372	AA	43 (12,7%)	A T	0,30 (30%) 0,70 (70%)
	AT	121 (35,7%)		
	TT	175 (51,6%)		
rs3807989	AA	70 (20,6%)	A G	0,47 (47%) 0,53 (53%)
	AG	182 (53,7%)		
	GG	87 (25,7%)		
rs1997623	AA	8 (2,4%)	A C	0,21 (21%) 0,79 (79%)
	AC	124 (36,6%)		
	CC	207 (61,1%)		

5.3 Associações dos polimorfismos do gene *CAV1* com a ocorrência das principais complicações cerebrovasculares na AF

Para as análises de associação, foram testados os modelos de herança genética recessivo, dominante, sobredominante e codominante para os três polimorfismos em estudo. Foram analisadas associações dos polimorfismos com a ocorrência do AVC, doença cerebrovascular, estratificações do DTC, faixa de alto risco para o AVC, dados laboratoriais e outras complicações cerebrovasculares. Nenhuma associação estatística foi observada em nenhum dos modelos de herança genética entre os polimorfismos rs7804372 e rs3807989 e as variáveis estudadas ($p > 0,05$). O resultado desta análise está representado na tabela 1 do material suplementar de acordo com o modelo de herança codominante pois é o que melhor representa os dados.

Além disso, foi realizada a análise univariada de riscos proporcionais de Cox para ambos SNPS intronicos rs7804372 e rs3807989 tendo o AVC como evento, não obtendo também nenhum dado estatisticamente relevante conforme ilustrado na tabela 5. O tempo de acompanhamento foi definido como o tempo transcorrido entre a data da admissão do paciente no HEMOPE e a data da sua última consulta.

Tabela 5: O modelo univariado de riscos proporcionais de Cox para os SNPS rs7804372 e rs3807989 tendo como variável de falha a ocorrência do AVC.

Variável	Genótipos	HR [95% CI]	p-Valor
rs7804372	AA vs AT vs TT	0.73 [0.42 – 1.28]	0.277
rs3807989	AA vs AG vs GG	0.90 [0.49 – 1.66]	0.750

Já para o polimorfismo rs1997623, algumas estatísticas significativamente relevantes foram encontradas. Seguindo o modelo de herança codominante, como ilustrado na tabela 6, este SNP se mostrou associado com o níveis de hemoglobina (P -valor = 0.047), Hematócrito (P -valor = 0.029), acometimento pelo AVC (P -valor = 0.003) e a DCV (P -valor = 0.011).

Tabela 6: Associação do polimorfismo rs1997623 do gene *CAV1* de acordo com o modelo de herança codominante com a ocorrência de AVC, DCV e com as variáveis relacionadas ao desenvolvimento de AVC em pacientes pediátricos com AF.

Características clínicas e laboratoriais rs1997623	Todos os pacientes N = 339 N (%)	Homozigoto selvagem AA Total: 8 N (%)	Heterozigoto AC Total: 124 N (%)	Homozigoto variante CC Total: 207 N (%)	p-valor
HbF (%)					
Mediana	9,60	8,00	9,80	9,35	0,570
Intervalo	1,10 – 27,90	3,20 – 17,00	1,10 – 27,40	1,60 – 27,90	
RBC ($\times 10^{12}/\text{MI}$)					
Mediana	2,62	2,47	2,63	2,61	0,543
Intervalo	1,64 – 4,98	1,85 – 2,71	1,64 – 3,90	1,66 – 4,98	
Hb (g/dL)					
Mediana	7,65	7,00	7,70	7,70	0,047*
Intervalo	4,80 – 11,60	5,20 – 7,50	5,30 – 10,60	4,80 – 11,60	
Ht (%)					
Mediana	22,75	20,15	22,60	23,30	0,029*
Intervalo	14,70 – 33,20	16,20 – 22,30	15,40 – 31,10	14,70 – 33,20	
VCM (fL)					
Mediana	86,90	86,90	85,70	87,30	0,456
Intervalo	53,40 – 103,40	75,60 – 95,70	72,40 – 103,40	53,40 – 102,90	
HCM (g/dL)					
Mediana	29,30	28,20	29,40	29,30	0,742
Intervalo	19,80 – 85,70	25,80 – 30,90	22,10 – 85,70	19,80 – 34,20	
WBC ($\times 10^3/\text{L}$)					
Mediana	14,68	14,90	13,95	14,92	0,736
Intervalo	2,10 – 48,90	8,94 – 19,60	3,30 – 32,20	2,10 – 48,10	
PLQ ($\times 10^3/\text{L}$)					
Mediana	454	487	466	441	0,669
Intervalo	49 – 1010	49 – 748	114 – 875	136 – 1010	
Reticulócitos (%)					
Mediana	10,40	10,70	10,60	9,90	0,858
Intervalo	1,50 – 29,20	6,20 – 22,10	1,50 – 25,30	1,50 – 29,20	
LDH (U/L)					
Mediana	824,00	606,00	724,00	859,50	0,256
Intervalo	12,40 – 2401,00	378,00 – 912,00	12,40 – 2219,00	211,00 – 2401,00	
BT (mg/dL)					
Mediana	1,94	1,81	1,93	1,94	0,923
Intervalo	0,38 – 39,00	1,18 – 5,10	0,38 – 7,46	0,50 – 39,00	
BI (mg/dL)					
Mediana	1,51	1,35	1,49	1,51	0,920
Intervalo	0,24 – 11,00	0,71 – 4,87	0,24 – 7,28	0,31 – 11,00	
Sexo					
Feminino	165 (48,7%)	7 (87,5%)	59 (47,5%)	99 (47,8%)	0,084
Masculino	174 (51,3%)	1 (12,5%)	65 (52,41%)	108 (52,2%)	
DTC					
Normal	213 (66,6%)	6 (75,0%)	67 (54,0%)	140 (67,6%)	0,115
Condicionante	73 (22,8%)	1 (12,5%)	30 (24,2%)	42 (20,3%)	
Alto Risco	34 (10,6%)	1 (12,5%)	18 (14,5%)	15 (7,2%)	

AVC						
Sim	25 (7,4%)	2 (25,0%)	15 (12,1%)	8 (3,9%)	0,003*	
Não	314 (92,6%)	6 (75,0%)	109 (87,9%)	199(96,1%)		
DCV						
Sim	48 (14,2%)	2 (25,0%)	26 (20,9%)	20 (9,7%)	0,011*	
Não	291 (85,8%)	6 (75,0%)	98 (79,1%)	187 (90,3%)		
FRAVC						
Sim	34 (10%)	1 (12,5%)	18 (14,5%)	15(7,3%)	0,100	
Não	305 (90%)	7 (87,5%)	106 (85,5%)	192(92,7%)		
OUTRAS COMPLICAÇÕES						
Sim	22 (6,6%)	0 (0%)	9 (7,2%)	13 (6,3%)	0,715	
Não	310 (93,4%)	8 (100%)	114 (91,9%)	188 (90,7%)		

HbF: Hemoglobina fetal, RBC: Hemácias, Hb: Hemoglobina, Ht: Hematócrito, VCM, Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, WBC: Leucócitos, PLT: Plaquetas, LDH: Lactato desidrogenase, BT: Bilirrubina total, BI: Bilirrubina indireta, DTC: Doppler transcraniano, AVC: Acidente vascular cerebral, DVC: Doença cerebrovascular.

O impacto do polimorfismo rs1997623 no modelo codominante (homozigoto variante CC, versus homozigoto selvagem AA versus heterozigoto AC) foi avaliado com relação ao tempo de desenvolvimento do AVC (idade em anos). A idade mediana para o desenvolvimento de AVC foi de 06 anos (intervalo: 2 a 12 anos). A média de seguimento para desenvolvimento de AVC foi de 17 anos (IC95%: 16 a 17 anos). Os pacientes homozigotos selvagens (AA), heterozigotos (AC) e homozigotos variantes (CC) apresentaram respectivamente um seguimento médio de 13 anos (IC95%: 10 a 17), 16 anos (IC95%: 15 a 16) e 17 anos (IC95%: 17 a 18) com taxa de desenvolvimento de AVC de 25% (AA), 12% (AC) e 3,4% (CC) ($P=0.007$) (Figura 7).

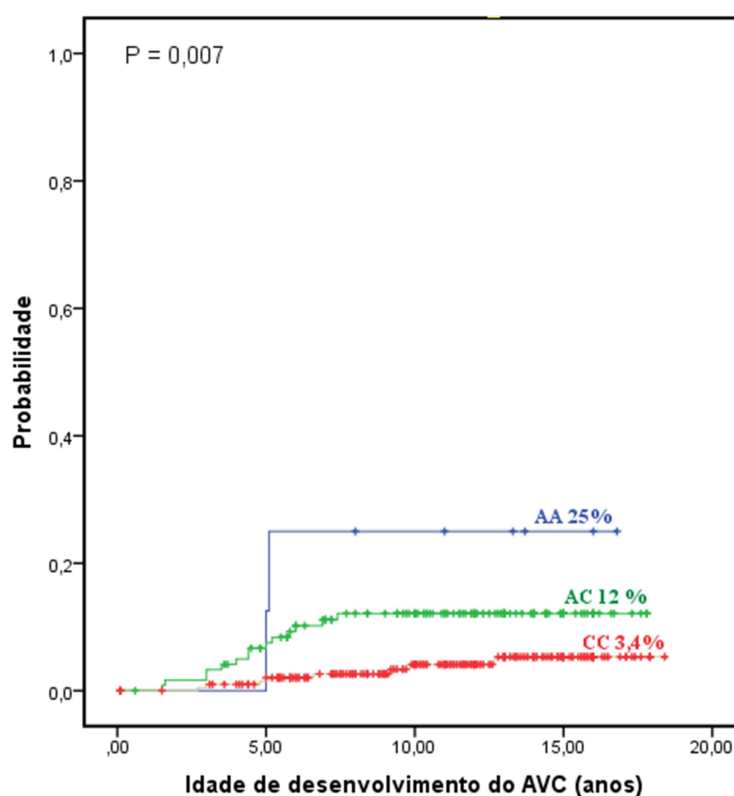


Figura 7: Probabilidade de acometimento pelo AVC dependente do genótipo para o polimorfismo rs1997623.

Ao se analisar a frequência do alelo selvagem A do polimorfismo rs1997623 e o acometimento pelo AVC, observamos que o mesmo está mais associado com o desenvolvimento dessa complicação quando comparado ao alelo polimórfico C ($P = 0.0032$; OR: 2.568; IC: 1.374 – 4.655), como ilustrado na tabela 7. Além disso, o mesmo cenário é observado em relação ao desenvolvimento de DCV ($P = 0.0092$; OR: 1.950; IC: 1.205 – 3.160), como pode ser visto na tabela 8.

Tabela 7: Análise alélica do polimorfismo rs1997623, para o desenvolvimento do AVC.

AVC	Alelos	
	A	C
Sim	19 (13,57%)	31 (5,76%)
Não	121 (86,43%)	507 (94,24%)
Total	140 (100%)	538 (100%)
$P = 0.0032$; OR: 2.568; IC: 1.374 – 4.655		

Tabela 8: Análise alélica do polimorfismo rs1997623, para o desenvolvimento da DCV.

DCV	Alelos	
	A	C
Sim	30 (21,43%)	66 (12,27%)
Não	110 (78,57%)	472 (87,73%)
Total	140 (100%)	538 (100%)
$P = 0.0092$; OR: 1.950; IC: 1.205 – 3.160		

Além disso, encontramos uma correlação estatística ($P = 0.008$) do rs1997623 na análise univariada de riscos proporcionais de Cox tendo o AVC como evento (tabela 9). Já na análise multivariada com o sexo, idade HbF e Haplótipo β s não observamos correlação estatisticamente relevante como ilustrado na tabela 10. Para ambos os testes, a ocorrência do AVC foi a variável de falha e o tempo de acompanhamento foi definido como o tempo transcorrido entre a data da admissão do paciente no HEMOPE e a data da sua última consulta.

Tabela 9: O modelo univariado de riscos proporcionais de Cox para O SNP rs1997623 tendo como variável de falha a ocorrência do AVC.

Variável	Genótipos	HR [95% CI]	p-Valor
rs1997623	AA vs AC vs CC	0.42 [0.22 – 0.80]	0.008

Tabela 10: O modelo multivariado de riscos proporcionais de Cox para O SNP rs1997623 tendo como variável de falha a ocorrência do AVC.

Variável	Genótipos	HR [95% CI]	p-Valor
rs1997623	AA vs AC vs CC	0.24 [0.04 – 1.36]	0.108
Sexo	Feminino vs Masculino	3.54 [0.50 – 24.98]	0.204
Idade	Variável contínua	0.88 [0.58 – 1.34]	0.578
HbF	High vs Low	0.27 [0.02 – 1.81]	0.276
Haplótipo β s	CAR/CAR vs Outros	3.59 [0.38 – 33.66]	0.262

Para categorização da hemoglobina fetal (HbF) foi realizada a mediana da coorte para este parâmetro (9.60%) e dois grupos foram formados: grupo “*high*” para dosagem de HbF > 9.60% e grupo “*Low*” para dosagem de HbF < 9.60%. Para categorização dos Haplótipos β s, os pacientes foram alocados em dois grupos: Grupo com genótipo CAR/CAR e grupo com todos os outros genótipos.

6.0 DISCUSSÃO

A busca por marcadores genéticos que possam auxiliar o DTC na estratificação de risco para o AVC em pacientes com AF se tornou de grande relevância. A necessidade de um painel mais sensível nessa estratificação pode ser ratificada pela evidência das taxas de ocorrência de AVC de acordo com o DTC em nossa coorte. O grupo de pacientes com DTC normal teve 3,28% de seus indivíduos acometidos pelo AVC e o grupo condicionante 5,47%. Isso nos mostra que o AVC pode acometer pacientes mesmo que estes não sejam enquadrados no grupo de alto risco segundo o DTC. Essa problemática levanta a hipótese de que se esses pacientes fossem estratificados de maneira mais sensível e enquadrados no grupo de alto risco, teriam sido submetidos a terapia profilática mais eficaz e o AVC teria maior chance de ser prevenido. Diante do exposto, diversos genes envolvidos na fisiopatologia da AF são estudados como possíveis marcadores, a exemplo deste trabalho, o gene *CAV1*.

CAV1 é um pequeno gene que abrange uma região genômica de 36.391 pb com 3 éxons e codifica a caveolina-1, um dos três membros da família caveolina e componente estrutural essencial da caveola (S. Chen et al., 2015, 2016). Além de estar envolvida em todos os processos já citados anteriormente e principalmente com a biodisponibilidade do óxido nítrico, de relevante importância para o cenário da AF, estudos apontam para outras funcionalidades da caveolina-1.

Devido a essas funcionalidades importantes, vários estudos têm implicado caveolina-1 na fisiopatologia de distúrbios metabólicos e inúmeras doenças cardiovasculares, porém nunca com a AF. Uma de suas funções foi demonstrada pelo envolvimento da cav-1 com mecanismos regulatórios iônicos afetando as funções dos canais de sódio e potássio nas células cardíacas bem como inibindo a via de sinalização do TGF- β 1, que desempenha um papel importante na fibrose atrial (S. Chen et al., 2015; Ulus et al., 2021). Além disso, o gene *CAV1* se demonstrou bastante expresso em tipos de células relevantes para a aterosclerose, envolvido no transporte de colesterol e com casos de hipertrigliceridemia. Adicionado á isso, foi observado que camundongos com esse gene nulo, possuíam um efeito protetor contra esse processo de aterosclerose (S. Chen et al., 2016; Mora-Garcia et al., 2017; Seifert et al., 2019). Este achado também a coloca em uma

posição importante no cenário do AVC de modo geral uma vez que dislipidemias podem proporcionar um ambiente vascular favorável para instalação de um AVC aterosclerótico, mesmo que este não seja o tipo de AVC estudado na AF.

O SNP rs3807989 já foi anteriormente correlacionado com a fibrilação atrial, com a Doença Arterial Coronariana, Infarto do Miocárdio (IM), síndrome de bronquiólite obliterante e a suscetibilidade ao carcinoma hepatocelular (S. Chen et al., 2015, 2016; Kastelijn et al., 2011; Ulus et al., 2021; Jian Zhang et al., 2017).Dentre essas complicações, podemos ressaltar os estudos que unem esse SNP a distúrbios cardiovasculares já que a disfunção endotelial visualizada na AF tem grande impacto nas suas manifestações clínicas, em especial o AVC.

Bem como o rs3807989, o rs7804372 também já possui largos estudos que o correlacionaram com o risco elevado de acidente vascular cerebral aterosclerótico de grandes artérias, risco de doença arterial coronariana doença e infarto do miocárdio (Shyu et al., 2017). Este achado o torna interessante por estar envolvido com o AVC aterosclerótico mas ainda não possui estudos se tratando do AVC isquêmico na AF. Além disso, o rs7804372 já foi correlacionado como marcador de risco para cânceres do sistema digestivo (principalmente gástrico e colorretal) (P. Chen et al., 2021) que apesar de não possuir muita correlação com o tema central do nosso estudo, demonstra a influencia desse SNP intrônico em diversos cenários patológicos. Os SNPs rs3807989 e o rs7804372 demonstraram em conjunto estarem associados também no cenário da tumorigênese com a suscetibilidade ao câncer de mama e gástrico, demonstrando que ambos os SNPs, apesar de serem intrônicos e não possuírem seus mecanismos elucidados, estão envolvidos processos patológicos de grande relevância (Li et al., 2020b).

Apesar de já terem sido relacionados com diversos distúrbios (majoritariamente nas populações asiáticas e europeias), os SNPs rs3807989 e o rs7804372 não se demonstraram associados neste trabalho com as variáveis analisadas, sendo importante ressaltar que este trabalho foi o primeiro que os uniu ao cenário da AF, sendo necessários maiores estudos para validação deste achado. Em contrapartida, algumas associações relevantes foram encontradas para o rs1997623.

O *CAV1* é expresso em uma variedade de células tumorais e por conta disso, estudos anteriores sugeriram que a expressão de *CAV1* pode inibir o crescimento do tumoral em seu início (Li et al., 2020b). Estudos envolvendo o rs1997623 demonstrou que seu alelo C pode aumentar o risco de aparecimento do câncer de mama enquanto o alelo A rs1997623 pode ser protetor (M. Wang et al., 2017). Esse SNP também foi associado com a ocorrência da síndrome metabólica e baixo níveis de colesterol HDL (do inglês “*High-Density Lipoprotein*”) (Nizam et al., 2018).

O presente estudo é o primeiro a associar o SNP rs1997623 com variáveis relacionadas ao acidente vascular cerebral no cenário da AF. Encontramos uma associação significativa desse polimorfismo com o AVC propriamente dito ($P=0.003$) e com a DCV ($P=0.011$). Além disso, foi observado que indivíduos com o genótipo selvagem AA possuem um risco maior para o desenvolvimento do AVC, seguido do genótipo heterozigoto e por fim o homozigoto variante CC ($P=0,007$), sugerindo um efeito protetivo proporcional a frequência do alelo variante C.

O mesmo resultado de risco para o AVC foi observado quando comparados os alelos individualmente: o alelo selvagem A demonstrou-se associado com um maior risco ($P = 0.0032$; OR: 2.568; IC: 1.374 – 4.655) comparado ao alelo variante C. A associação de alelos com a DCV também manteve o mesmo padrão observado em relação ao AVC, conferindo ao alelo selvagem A um risco maior para a complicação ($P = 0.0092$; OR: 1.950; IC: 1.205 – 3.160) o que corrobora com a hipótese de que este SNP possa conferir caráter protetivo contra essas manifestações.

Em adição á estes achados, tivemos a correlação estatística do rs1997623 ($P=0.008$) na análise do modelo univariado de riscos proporcionais de Cox frente ao AVC, o que ratifica nosso achado da curva de sobrevida. Entretanto, já na análise multivariada, correlacionando o mesmo SNP com a idade, sexo, porcentagem de HbF e haplótipos β s, a estatística não se demonstrou relevante ($P=0.108$).

Como já mencionado neste trabalho, a caveolina regula negativamente a atividade de numerosas moléculas sinalizadoras, incluindo a óxido nítrico sintase endotelial, enzima responsável pela formação do vasodilatador oxido nítrico (Li et al., 2020b). Sendo assim, sua maior expressão contribuiria para um ambiente molecular

mais favorável ao desenvolvimento de vaso-oclusões uma vez que a biodisponibilidade do NO estaria reduzida.

Frente a esse cenário, hipotetizamos que a ação protetiva do alelo rs1997623-C em relação aos eventos estudados possa se dar pela diminuição da expressão do gene *CAV1*, aumentando a biodisponibilidade do óxido nítrico e desfavorecendo assim, a instalação de um quadro de complicações cerebrovasculares de cunho vasooclusivo.

Um estudo realizado por Madhoun et al. (2022) nos mostra que esse SNP se encontra em uma região de ligação de vários fatores de transcrição que regulam a região promotora do gene e esse polimorfismo pode alterar esse sítio de ligação. Este mesmo trabalho mostrou que em pré-adipócitos o alelo “A” aumentou o recrutamento do fator EBF1 (*do inglês: early B-cell factor 1*) provocando um aumento da expressão gênica, enquanto que o alelo “C” estava relacionado com menor acetilação de histonas, menor recrutamento de fatores de transcrição e níveis mais baixos de expressão do *CAV1* (Madhoun et al., 2022).

O achado do estudo citado acima corrobora a nossa hipótese, entretanto maiores estudos se fazem necessários uma vez que o perfil de expressão da Caveolina-1 e a regulação dessa expressão podem mudar de acordo com o tipo celular (Madhoun et al., 2022). Dito isso, esclarecimentos a cerca dessa expressão em células endoteliais são essenciais para que a hipótese levantada em nosso estudo possa ser de fato validada.

7.0 CONCLUSÕES

- Os SNPs rs3807989 e o rs7804372 do gene *CAV1* não se mostraram associados com as principais complicações clínicas observadas em pacientes com AF na população estudada;
- O SNP rs1997623 do gene *CAV1* mostrou-se associado com o desenvolvimento do acidente vascular cerebral (AVC) e com a doença cerebrovascular (DCV);
- Pacientes com genótipo AA (homozigoto selvagem) para o polimorfismo rs1997623, apresentaram um maior risco de desenvolvimento de AVC e DCV, quando comparados com os genótipos AC (heterozigoto) e CC(homozigoto mutado);

8.0 REFERÊNCIAS

- Aaslid, R., Markwalder, T. M., & Nornes, H. (1982). Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries. *Journal of Neurosurgery*, 57(6), 769–774. <https://doi.org/10.3171/jns.1982.57.6.0769>
- Adams, R. J., McKie, V. C., Hsu, L., Files, B., Vichinsky, E., Pegelow, C., Abboud, M., Gallagher, D., Kutlar, A., Nichols, F. T., Bonds, D. R., & Brambilla, D. (1998). Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial doppler. *The New England Journal of Medicine*, 339, 5–11.
- Aggeli, C., Polytarchou, K., Dimitroglou, Y., Patsourakos, D., Delicou, S., Vassilopoulou, S., Tsiamis, E., & Tsioufis, K. (2021). Stroke and presence of patent foramen ovale in sickle cell disease. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 52(3), 889–897. <https://doi.org/10.1007/s11239-021-02398-3>
- Antwi-Boasiako, C., & Campbell, A. D. (2018). Low nitric oxide level is implicated in sickle cell disease and its complications in Ghana. *Vascular Health and Risk Management*, 14, 199–204. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S163228>
- Antwi-Boasiako, C., Dzudzor, B., Kudzi, W., Doku, A., Dale, C., Sey, F., Otu, K., Boatemaa, G., Ekem, I., Ahenkorah, J., Achel, D., Aboagye, E., & Donkor, E. (2018). Association between eNOS Gene Polymorphism (T786C and VNTR) and Sickle Cell Disease Patients in Ghana. *Diseases*, 6(4), 90. <https://doi.org/10.3390/diseases6040090>
- Azar, S., & Wong, T. E. (2017). Sickle Cell Disease: A Brief Update. *Medical Clinics of North America*, 101(2), 375–393. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2016.09.009>
- Azbell, R. C. G., & Desai, P. C. (n.d.). *Treatment dilemmas: strategies for priapism, chronic leg ulcer disease, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. ischemic*, 411–417.
- Ballas, S. K. (2018). Sickle cell disease: Classification of clinical complications and approaches to preventive and therapeutic management. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 68(2–3), 105–128. <https://doi.org/10.3233/CH-189002>
- Belisário, A. R., Sales, R. R., Toledo, N. E., Velloso-Rodrigues, C., Silva, C. M., & Viana, M. B. (2015). Association between ENPP1 K173Q and stroke in a newborn cohort of 395 Brazilian children with sickle cell anemia. *Blood*, 126(10),

- 1259–1260. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-05-645176>
- BRASIL. (2015). Doença Falciforme: Diretrizes Básicas da Linha de Cuidado. In *Brazilia, DF* (Vol. 1).
- Butz, A. M., & Christopher S. von Bartheld, J. B. and S. H.-H. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(12), 139–148. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315081.Xanthine>
- Castellanos, M., Van Eendenburg, C., Gubern, C., Kádár, E., Huguet, G., Puig, J., Sobrino, T., Blasco, G., Serena, J., & Sánchez, J. M. (2018). Low levels of caveolin-1 predict symptomatic bleeding after thrombolytic therapy in patients with acute ischemic stroke. *Stroke*, 49(6), 1525–1527. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.020683>
- Chen, P., Zhang, Y.-L., Xue, B., & Wang, J.-R. (2021). CAV1 rs7804372 (T29107A) polymorphism might be a potential risk for digestive cancers. *Medicine*, 100(24), e26186. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000026186>
- Chen, S., Wang, C., Wang, X., Xu, C., Wu, M., Wang, P., Tu, X., & Wang, Q. K. (2015). Significant Association Between CAV1 Variant rs3807989 on 7p31 and Atrial Fibrillation in a Chinese Han Population. *Journal of the American Heart Association*, 4(5), 1–9. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.001980>
- Chen, S., Wang, X., Wang, J., Zhao, Y., Wang, D., Tan, C., Fa, J., Zhang, R., Wang, F., Xu, C., Huang, Y., Li, S., Yin, D., Xiong, X., Li, X., Chen, Q., Tu, X., Yang, Y., Xia, Y., ... Wang, Q. K. (2016). Genomic variant in CAV1 increases susceptibility to coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 246, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.008>
- Connes, P., Verlhac, S., & Bernaudin, F. (2013). Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, 161(4), 484–498. <https://doi.org/10.1111/bjh.12300>
- Conran, N., Franco-Penteado, C. F., & Costa, F. F. (2009). Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin*, 33(1), 1–16. <https://doi.org/10.1080/03630260802625709>
- Crow, A. (2020). Transcranial Doppler in children with sickle cell disease: Five years' of screening experience. *Australasian Journal of Ultrasound in Medicine*, 23(1), 39–46. <https://doi.org/10.1002/ajum.12192>
- Darbari, D. S., Sheehan, V. A., & Ballas, S. K. (2020). The vaso-occlusive pain crisis in sickle cell disease: Definition, pathophysiology, and management. *European*

- Journal of Haematology*, 105(3), 237–246. <https://doi.org/10.1111/ejh.13430>
- Darshana, T., Rees, D., & Premawardhena, A. (2021). Hydroxyurea and blood transfusion therapy for Sickle cell disease in South Asia: inconsistent treatment of a neglected disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-01781-w>
- DeBaun, M. R., Jordan, L. C., King, A. A., Schatz, J., Vichinsky, E., Fox, C. K., McKinstry, R. C., Telfer, P., Kraut, M. A., Daraz, L., Kirkham, F. J., & Murad, M. H. (2020). American Society of Hematology 2020 guidelines for sickle cell disease: Prevention, diagnosis, and treatment of cerebrovascular disease in children and adults. *Blood Advances*, 4(8), 1554–1588. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001142>
- DeBaun, Michael R., Armstrong, F. D., McKinstry, R. C., Ware, R. E., Vichinsky, E., & Kirkham, F. J. (2012). Silent cerebral infarcts: A review on a prevalent and progressive cause of neurologic injury in sickle cell anemia. *Blood*, 119(20), 4587–4596. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-272682>
- Delesderrier, E., Curioni, C., Omena, J., Macedo, C. R., Cople-Rodrigues, C., & Citelli, M. (2020). Antioxidant nutrients and hemolysis in sickle cell disease. *Clinica Chimica Acta*, 510(May), 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.07.020>
- Desai, A. A., Zhou, T., Ahmad, H., Zhang, W., Mu, W., Trevino, S., Wade, M. S., Raghavachari, N., Kato, G. J., Peters-Lawrence, M. H., Thiruvoipati, T., Turner, K., Artz, N., Huang, Y., Patel, A. R., Yuan, J. X. J., Gordeuk, V. R., Lang, R. M., Garcia, J. G. N., & Machado, R. F. (2012). A novel molecular signature for elevated tricuspid regurgitation velocity in sickle cell disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(4), 359–368. <https://doi.org/10.1164/rccm.201201-0057OC>
- Doulias, P. T., & Tenopoulou, M. (2020). Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. *F1000Research*, 9, 1–10. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19998.1>
- Driss, A., Asare, K. O., Hibbert, J. M., Gee, B. E., Adamkiewicz, T. V., & Stiles, J. K. (2009). Sickle cell disease in the post genomic era: A monogenic disease with a polygenic phenotype. In *Genomics Insights* (Vol. 2, Issue 1, pp. 23–48).
- Eaton, W. A. (2022). Impact of hemoglobin biophysical studies on molecular pathogenesis and drug therapy for sickle cell disease. *Molecular Aspects of*

- Medicine*, 84(July 2021), 100971. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.100971>
- Estcourt, L. J., Kohli, R., Hopewell, S., Trivella, M., & Wang, W. C. (2020). Blood transfusion for preventing primary and secondary stroke in people with sickle cell disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2020(7). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003146.pub4>
- Ezekekwa, C. A., Kotila, T. R., Akingbola, T. S., Lettre, G., Gordeuk, V. R., Cooper, R. S., DeBaun, M. R., Inusa, B., & Tayo, B. O. (2018). Sickle Cell Disease Clinical Trials and Phenotypes. *Journal of Tropical Diseases*, 06(02), 1–12. <https://doi.org/10.4172/2329-891x.1000259>
- Ferriero, D. M., Fullerton, H. J., Bernard, T. J., Billinghamurst, L., Daniels, S. R., Debaun, M. R., Deveber, G., Ichord, R. N., Jordan, L. C., Massicotte, P., Meldau, J., Roach, E. S., & Smith, E. R. (2019). Management of stroke in neonates and children: A scientific statement from the American Heart Association/American stroke association. In *Stroke* (Vol. 50, Issue 3). <https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000183>
- Ferrone, F. A. (2018). Targeting HbS Polymerization. *Seminars in Hematology*, 55(2), 53–59. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.04.012>
- Fertrin, K. Y., & Costa, F. F. (2010). Genomic polymorphisms in sickle cell disease: Implications for clinical diversity and treatment. *Expert Review of Hematology*, 3(4), 443–458. <https://doi.org/10.1586/ehm.10.44>
- Flanagan, J. M., Sheehan, V., Linder, H., Howard, T. A., Wang, Y. D., Hoppe, C. C., Aygun, B., Adams, R. J., Neale, G. A., & Ware, R. E. (2013). Genetic mapping and exome sequencing identify 2 mutations associated with stroke protection in pediatric patients with sickle cell anemia. *Blood*, 121(16), 3237–3245. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-464156>
- Franceschi, L. De, Cappellini, M. D., & Olivieri, O. (2011). Thrombosis and Sickle Cell Disease. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 3(1).
- Frenette, P. S., Atweh, G. F., Frenette, P. S., & Atweh, G. F. (2007). *Sickle cell disease : old discoveries , new concepts , and future promise Find the latest version : Science in medicine Sickle cell disease : old discoveries , new concepts , and future promise*. 117(4), 850–858. <https://doi.org/10.1172/JCI30920.850>
- Gemel, J., Zhang, J., Mao, Y., Lapping-carr, G., & Beyer, E. C. (2022). Circulating Small Extracellular Vesicles May Contribute to Vaso-Occlusive Crises in Sickle Cell Disease. *Journal of Clinical Medicine*, 11(3).

- <https://doi.org/10.3390/jcm11030816>
- Ghafuri, D. L., Abdullahi, S. U., Dambatta, A. H., Galadanci, J., Tabari, M. A., Bello-Manga, H., Idris, N., Inuwa, H., Tijjani, A., Suleiman, A. A., Jibir, B. W., Gambo, S., Gambo, A. I., Khalifa, Y., Haliru, L., Abdurashied, S., Zakari, M. A., Greene, B. C., Trevathan, E., ... DeBaun, M. R. (2022). Establishing Sick Cell Disease Stroke Prevention Teams in Africa is Feasible: Program Evaluation Using the RE-AIM Framework. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 44(1), E56–E61. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000002179>
- Glaros, A. K., Razvi, R., Shah, N., & Zaidi, A. U. (2021). Voxelotor: alteration of sickle cell disease pathophysiology by a first-in-class polymerization inhibitor. *Therapeutic Advances in Hematology*, 12, 1–16. <https://doi.org/10.1177/20406207211001136>
- Habara, A., & Steinberg, M. H. (2016). Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. *Experimental Biology and Medicine*, 241(7), 689–696. <https://doi.org/10.1177/1535370216636726>
- Hallmark, L., Almeida, L. E. F., Kamimura, S., Smith, M., & Quezado, Z. M. N. (2021). Nitric oxide and sickle cell disease—Is there a painful connection? *Experimental Biology and Medicine*, 246(3), 332–341. <https://doi.org/10.1177/1535370220976397>
- Han, H., Hensch, L., & Tubman, V. N. (2021). Indications for transfusion in the management of sickle cell disease. *Hematology (United States)*, 2021(1), 696–703. <https://doi.org/10.1182/hematology.2021000307>
- Hoppe, C., Klitz, W., D'Harlingue, K., Cheng, S., Grow, M., Steiner, L., Noble, J., Adams, R., & Styles, L. (2007). Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Stroke*, 38(8), 2241–2246. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.483115>
- Hsieh, M. J., Lee, C. H., Chueh, H. Y., Chang, G. J., Huang, H. Y., Lin, Y., & Pang, J. H. S. (2020). Modulatory effects of BPC 157 on vasomotor tone and the activation of Src-Caveolin-1-endothelial nitric oxide synthase pathway. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74022-y>
- Huang, Q., Zhong, W., Hu, Z., & Tang, X. (2018). A review of the role of cav-1 in neuropathology and neural recovery after ischemic stroke. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1387-y>

- James, B. (1910). *Peculiar Physical*. VI(5), 517.
- Jang, T., Poplawska, M., Cimpeanu, E., Mo, G., Dutta, D., & Lim, S. H. (2021). Vaso-occlusive crisis in sickle cell disease: a vicious cycle of secondary events. *Journal of Translational Medicine*, 19(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03074-z>
- Jia, G. L., Huang, Q., Cao, Y. N., Xie, C. S., Shen, Y. J., Chen, J. L., Lu, J. H., Zhang, M. B., Li, J., Tao, Y. X., & Cao, H. (2020). Cav-1 participates in the development of diabetic neuropathy pain through the TLR4 signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 235(3), 2060–2070. <https://doi.org/10.1002/jcp.29106>
- Johnson, C. S. (2016). Sickle-Cell Disease. *International Encyclopedia of Public Health*, 506–512. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00408-2>
- Kamat, A. S., & Thomas, D. R. (2012). Anaemia. *Pathy's Principles and Practice of Geriatric Medicine: Fifth Edition*, 1(9778), 329–341. <https://doi.org/10.1002/9781119952930.ch28>
- Kastelijn, E. A., van Moorsel, C. H. M., Kazemier, K. M., Roothaan, S. M., Ruven, H. J. T., Kwakkel-van Erp, J. M., van de Graaf, E. A., Zanen, P., van Kessel, D. A., & Grutters, J. C. (2011). A genetic polymorphism in the CAV1 gene associates with the development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Fibrogenesis and Tissue Repair*, 4(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-4-24>
- Kato, G. J., Gladwin, M. T., & Steinberg, M. H. (2007). Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Reviews*, 21(1), 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2006.07.001>
- Kato, G. J., Piel, F. B., Reid, C. D., Gaston, M. H., Ohene-Frempong, K., Krishnamurti, L., Smith, W. R., Panepinto, J. A., Weatherall, D. J., Costa, F. F., & Vichinsky, E. P. (2018). Sickle cell disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 18010. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.10>
- Kato, G. J., Steinberg, M. H., & Gladwin, M. T. (2017). Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *Journal of Clinical Investigation*, 127(3), 750–760. <https://doi.org/10.1172/JCI89741>
- Khaibullina, A., Almeida, L. E. F., Kamimura, S., Patricia, M., Smith, M., Vogel, S., Wakim, P., Olavo, M., Quezado, M. M., Horkayne-szakaly, I., Zenaide, M. N.,

- Service, C. E., & Monitoring, I. N. (2022). *HHS Public Access*. 1–32. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2020.102493>. Sickle
- Kija, E. N., Saunders, D. E., Munubhi, E., Darekar, A., Barker, S., Cox, T. C. S., Mango, M., Soka, D., Komba, J., Nkya, D. A., Cox, S. E., Kirkham, F. J., & Newton, C. R. J. C. (2019). Transcranial Doppler and Magnetic Resonance in Tanzanian Children with Sickle Cell Disease. *Stroke*, 50(7), 1719–1726. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.018920>
- Kirkham, F. J., & Lagunju, I. A. (2021). Epidemiology of stroke in sickle cell disease. *Journal of Clinical Medicine*, 10(18). <https://doi.org/10.3390/jcm10184232>
- Kornberg, H. L., & Krebs, H. A. (1957). © 1957 Nature Publishing Group. *Group Nature Publishing*, 180, 756–757.
- Kuikel, S., Rauniyar, R., Kharel, S., Bist, A., Giri, S., Thapaliya, S., & Paudel, S. (2021). Prevalence of Stroke in Asian Patients with Sickle Cell Anemia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neurology Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9961610>
- Li, B., Zhang, C., Wang, J., Zhang, M., Liu, C., & Chen, Z. (2020a). Impact of genetic variants of ABCB1, APOB, CAV1, and NAMPT on susceptibility to pancreatic ductal adenocarcinoma in Chinese patients. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 8(6), 1–12. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1226>
- Li, B., Zhang, C., Wang, J., Zhang, M., Liu, C., & Chen, Z. (2020b). Impact of genetic variants of ABCB1, APOB, CAV1, and NAMPT on susceptibility to pancreatic ductal adenocarcinoma in Chinese patients. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, February, 1–12. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1226>
- Lian, X., Matthaeus, C., Kaßmann, M., Daumke, O., & Gollasch, M. (2019). Pathophysiological Role of Caveolae in Hypertension. *Frontiers in Medicine*, 6(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00153>
- Linder, G. E., & Chou, S. T. (2021). Red cell transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. *Haematologica*, 106(7), 1805–1815. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.270546>
- Lizarralde-Iragorri, M. A., & Shet, A. S. (2020). Sickle cell disease: A paradigm for venous thrombosis pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21155279>
- Mack, A. K., & Thompson, A. A. (2017). Primary and Secondary Stroke Prevention in Children With Sickle Cell Disease. *Journal of Pediatric Health Care*, 31(2), 145–

154. <https://doi.org/10.1016/j.pedhc.2016.06.005>
- Madhoun, A. Al, Haddad, D., Nizam, R., Miranda, L., Kochumon, S., Thomas, R., Thanaraj, T. A., Ahmad, R., & Bitar, M. S. (2022). *Adipose Tissue CAV1 Protein Overexpression*.
- Mierke, J., Christoph, M., Augstein, A., Pfluecke, C., Jellinghaus, S., Woitek, F., Strasser, R. H., Poitz, D. M., & Ibrahim, K. (2020). Influence of caveolin-1 and endothelial nitric oxide synthase on adventitial inflammation in aortic transplants. *Kardiologia Polska*, 78(2), 124–130. <https://doi.org/10.33963/KP.15079>
- Mollace, V., Tavernese, A., & Mollace, R. (2020). The essential role of a “healthy” relationship between caveolin-1 and endothelial nitric oxide synthase in counteracting vascular inflammation and atherothrombosis. *Kardiologia Polska*, 78(2), 96–97. <https://doi.org/10.33963/KP.15203>
- Mora-Garcia, G. J., Ruiz-Diaz, M. S., Gomez-Camargo, D. E., & Gomez-Alegria, C. J. (2017). Frequency of common polymorphisms in Caveolin 1 (CAV1) gene in adults with high serum triglycerides from Colombian Caribbean Coast. *Colombia Medica*, 48(4), 166–172. <https://doi.org/10.25100/cm.v48i4.2625>
- Nader, E., Romana, M., & Connes, P. (2020). The Red Blood Cell—Inflammation Vicious Circle in Sickle Cell Disease. *Frontiers in Immunology*, 11(March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00454>
- Nader, E., Romana, M., Guillot, N., Fort, R., Stauffer, E., Lemonne, N., Garnier, Y., Skinner, S. C., Etienne-Julan, M., Robert, M., Gauthier, A., Cannas, G., Antoine-Jonville, S., Tressières, B., Hardy-Dessources, M. D., Bertrand, Y., Martin, C., Renoux, C., Joly, P., ... Connes, P. (2020). Association Between Nitric Oxide, Oxidative Stress, Eryptosis, Red Blood Cell Microparticles, and Vascular Function in Sickle Cell Anemia. *Frontiers in Immunology*, 11(November), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.551441>
- Nizam, R., Al-Ozairi, E., Goodson, J. M., Melhem, M., Davidsson, L., Alkhandari, H., Al Madhoun, A., Shamsah, S., Qaddoumi, M., Alghanim, G., Alhasawi, N., Abu-Farha, M., Abubaker, J., Shi, P., Hartman, M. L., Tavares, M., Bitar, M., Ali, H., Arefanian, H., ... Al-Mulla, F. (2018). Caveolin-1 Variant Is Associated With the Metabolic Syndrome in Kuwaiti Children. *Frontiers in Genetics*, 9(December), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00689>
- Novelli, E. M., & Gladwin, M. T. (2016). Crises in sickle cell disease. *Chest*, 149(4), 1082–1093. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2015.12.016>

- Onimoe, G., & Rotz, S. (2020). Sick cell disease: A primary care update. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 87(1), 19–27. <https://doi.org/10.3949/ccjm.87a.18051>
- Osunkwo, I., Andemariam, B., Minniti, C. P., Inusa, B. P. D., El Rassi, F., Francis-Gibson, B., Nero, A., Trimnell, C., Abboud, M. R., Arlet, J. B., Colombatti, R., de Montalembert, M., Jain, S., Jastaniah, W., Nur, E., Pita, M., DeBonnett, L., Ramscar, N., Bailey, T., ... James, J. (2021). Impact of sickle cell disease on patients' daily lives, symptoms reported, and disease management strategies: Results from the international Sickle Cell World Assessment Survey (SWAY). *American Journal of Hematology*, 96(4), 404–417. <https://doi.org/10.1002/ajh.26063>
- Pakula, A. (2019). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Methods Molecular Biology*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.3233/CH-189009>. Nitric
- Phillips, S. M., Schlenz, A. M., Mueller, M., Melvin, C. L., Adams, R. J., & Kanter, J. (2021). Identified barriers and facilitators to stroke risk screening in children with sickle cell anemia: results from the DISPLACE consortium. *Implementation Science Communications*, 2(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s43058-021-00192-z>
- Piccin, A., Murphy, C., Eakins, E., Rondinelli, M. B., Daves, M., Vecchiato, C., Wolf, D., Mc Mahon, C., & Smith, O. P. (2019). Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anaemia and possible treatment. *European Journal of Haematology*, 102(4), 319–330. <https://doi.org/10.1111/ejh.13212>
- Piel, F. B., Patil, A. P., Howes, R. E., Nyangiri, O. A., Gething, P. W., Dewi, M., Temperley, W. H., Williams, T. N., Weatherall, D. J., & Hay, S. I. (2013). Global epidemiology of Sickle haemoglobin in neonates: A contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *The Lancet*, 381(9861), 142–151. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61229-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61229-X)
- Piel, F. B., Patil, A. P., Howes, R. E., Nyangiri, O. A., Gething, P. W., Williams, T. N., Weatherall, D. J., & Hay, S. I. (2010). Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nature Communications*, 1(8). <https://doi.org/10.1038/ncomms1104>
- Pushpakumar, S., Kundu, S., & Sen, U. (2019). Hydrogen Sulfide Protects Hyperhomocysteinemia-Induced Renal Damage by Modulation of Caveolin and eNOS Interaction. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38467-6>

- Rampersaud, E., Kang, G., Palmer, L. E., Rashkin, S. R., Wang, S., Bi, W., Alberts, N. M., Anghelescu, D., Barton, M., Birch, K., Boulos, N., Brandow, A. M., Brooke, R. J., Chang, T. C., Chen, W., Cheng, Y., Ding, J., Easton, J., Hodges, J. R., ... Weiss, M. J. (2021). A polygenic score for acute vaso-occlusive pain in pediatric sickle cell disease. *Blood Advances*, 5(14), 2839–2851. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004634>
- Rees, D. C., Williams, T. N., & Gladwin, M. T. (2010). Sickle-cell disease. *The Lancet*, 376(9757), 2018–2031. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61029-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61029-X)
- Rehman, R., Saadat, S. B., Tran, D. H., Constantinescu, S., & Qamruzzaman, Y. (2021). Recurrent Hyperhemolysis Syndrome in Sickle Cell Disease. *Cureus*, 13(5), 13–15. <https://doi.org/10.7759/cureus.14991>
- Rigano, P., De Franceschi, L., Sainati, L., Piga, A., Piel, F. B., Cappellini, M. D., Fidone, C., Masera, N., Palazzi, G., Gianesin, B., & Forni, G. L. (2018). Real-life experience with hydroxyurea in sickle cell disease: A multicenter study in a cohort of patients with heterogeneous descent. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 69(May), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2017.08.017>
- Rumaney, M. B., Ngo Bitoungui, V. J., Vorster, A. A., Ramesar, R., Kengne, A. P., Ngogang, J., & Wonkam, A. (2014). The co-inheritance of alpha-thalassemia and sickle cell anemia is associated with better hematological indices and lower consultations rate in Cameroonian patients and could improve their survival. *PLoS ONE*, 9(6), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100516>
- Sabarense, A. P., Silva, C. M., Muniz, M. B. de S. R., & Viana, M. B. (2021). Follow-up of children with sickle cell anemia screened with transcranial Doppler and enrolled in a primary prevention program of ischemic stroke. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, xx, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.05.001>
- Sales, R. R., Nogueira, B. L., Tosatti, J. A. G., Gomes, K. B., & Luizon, M. R. (2022). Do Genetic Polymorphisms Affect Fetal Hemoglobin (HbF) Levels in Patients With Sickle Cell Anemia Treated With Hydroxyurea? A Systematic Review and Pathway Analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 12(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.779497>
- Sean E. Rossiter, Madison H. Fletcher, and W. M. W. (2021). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Natural Products as Platforms To Overcome Antibiotic Resistance* Sean, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2020.10.006>. Intracranial

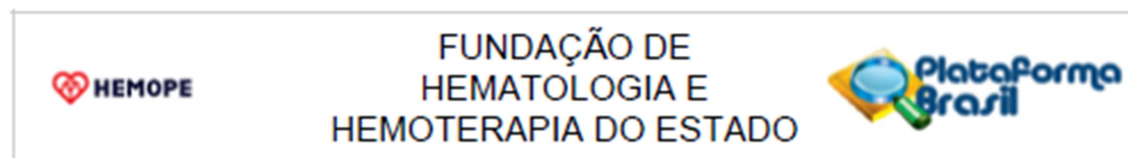
- Seifert, M. B., Olesen, M. S., Christophersen, I. E., Nielsen, J. B., Carlson, J., Holmqvist, F., Tveit, A., Haunsø, S., Svendsen, J. H., & Platonov, P. G. (2019). Genetic variants on chromosomes 7p31 and 12p12 are associated with abnormal atrial electrical activation in patients with early-onset lone atrial fibrillation. *Annals of Noninvasive Electrocardiology*, 24(6), 1–9. <https://doi.org/10.1111/anec.12661>
- Serjeant, G. R., & Vichinsky, E. (2018). Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 70(March), 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2017.06.004>
- Shyu, H. Y., Chen, M. H., Hsieh, Y. H., Shieh, J. C., Yen, L. R., Wang, H. W., & Cheng, C. W. (2017). Association of eNOS and Cav-1 gene polymorphisms with susceptibility risk of large artery atherosclerotic stroke. *PLoS ONE*, 12(3), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174110>
- Steinberg, M. H. (2020). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*, 136(21), 2392–2400. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2020007645>
- Sugie, S., Tsukino, H., Yamauchi, T., Mukai, S., Fujii, M., Shibata, N., Kuroda, Y., & Kamoto, T. (2013). Functional polymorphism in the CAV1 T29107A gene and its association with prostate cancer risk among Japanese men. *Anticancer Research*, 33(3), 1023–1028.
- Sundd, P. (2019). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838>. Pathophysiology
- Talha, M., Osman, B., Abdalla, S., Mirghani, H., & Abdoon, I. (2022). Pediatric Sickle Cell Disease in Sudan: Complications and Management. *Anemia*, 2022, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2022/3058012>
- Thein, M. S., Igbineweka, N. E., & Thein, S. L. (2017). Sickle cell disease in the older adult. *Pathology*, 49(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2016.10.002>
- Tian, J., Popal, M. S., Huang, R. C., Zhang, M., Zhao, X., Zhang, M., & Song, X. (2020). Caveolin as a novel potential therapeutic target in cardiac and vascular diseases: A mini review. *Aging and Disease*, 11(2), 378–389. <https://doi.org/10.14336/AD.2019.09603>
- Troiano, J. A., Potje, S. R., Graton, M. E., Gonçalves, E. T., Tostes, R. C., & Antoniali, C. (2021). Caveolin-1/Endothelial Nitric Oxide Synthase Interaction Is

- Reduced in Arteries From Pregnant Spontaneously Hypertensive Rats. *Frontiers in Physiology*, 12(November). <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.760237>
- Ulus, T., Dural, M., Mese, P., Yetmis, F., Mert, K. U., Gorenec, B., Cilingir, O., Gokalp, E. E., Arslan, S., Artan, S., Aykac, O., Colak, E., Yorgun, H., Canpolat, U., & Aytemir, K. (2021). Genetic variants associated with atrial fibrillation and long-Term recurrence after catheter ablation for atrial fibrillation in Turkish patients. *Anatolian Journal of Cardiology*, 25(2), 129–138. <https://doi.org/10.14744/AnatolJCardiol.2020.44082>
- Vorst, E. P. C. Van Der. (2020). *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins* (Vol. 94). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7>
- Wang, M., Tian, T., Ma, X., Zhu, W., Guo, Y., Duan, Z., Fan, J., Lin, S., Liu, K., Zheng, Y., Sheng, Q., Dai, Z. J., & Peng, H. (2017). Genetic polymorphisms in caveolin-1 associate with breast cancer risk in Chinese Han population. *Oncotarget*, 8(53), 91654–91661. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21560>
- Wang, Y., Hardy, S. J., Ichesco, E., Zhang, P., Harris, R. E., & Darbari, D. S. (2022). Alteration of grey matter volume is associated with pain and quality of life in children with sickle cell disease. *Translational Research*, 240, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.08.004>
- Ware, R. E., de Montalembert, M., Tshilolo, L., & Abboud, M. R. (2017). Sickle cell disease. *The Lancet*, 390(10091), 311–323. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30193-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30193-9)
- Wei Liu, Margo MacDonald, and J. Y., Scholz, J., Solokov, M., & O'connor. (2019). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.020482>Advances
- Williams, T. N., & Thein, S. L. (2018). Sickle cell anemia and its phenotypes. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 19, 113–147. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083117-021320>
- Wonkam, A., Makani, J., Ofori-Aquah, S., Nnodu, O. E., Treadwell, M., Royal, C., & Ohene-Frempong, K. (2015). Sickle cell disease and H3Africa: Enhancing genomic research on cardiovascular diseases in African patients. *Cardiovascular Journal of Africa*, 26(2), S50–S55. <https://doi.org/10.5830/CVJA-2015-040>
- Yan, C., Sun, C., Ding, X., Rizeq, F. K., Ren, M., Yang, F., Chen, Y., & Wang, B. (2019). Association of CAV1 polymorphisms with the risks of breast cancer: A

- systematic review and meta-analysis. *Pathology Research and Practice*, 215(9), 152518. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152518>
- Zhang, Jian, Xue, F., Chen, S., Zhang, D., Lu, C., & Tang, G. (2017). The influence of caveolin-1 gene polymorphisms on hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma susceptibility in Chinese Han population. *Medicine (United States)*, 96(42). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000007359>
- Zhang, Jun, Zhu, W., Xiao, L., Cao, Q., Zhang, H., Wang, H., Ye, Z., Hao, Y., Dai, Q., Sun, W., Xiong, Y., Liu, X., Ye, R., & Xu, G. (2016). Lower Serum Caveolin-1 Is Associated with Cerebral Microbleeds in Patients with Acute Ischemic Stroke. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(December 2014), 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/9026787>
- Zhang, X., Ramírez, C. M., Aryal, B., Madrigal-Matute, J., Liu, X., Diaz, A., Torrecilla-Parra, M., Suárez, Y., Cuervo, A. M., Sessa, W. C., & Fernández-Hernando, C. (2020). Cav-1 (Caveolin-1) Deficiency Increases Autophagy in the Endothelium and Attenuates Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1(June). <https://doi.org/10.1161/atvbaha.120.314291>
- Zheng, Y., & Chou, S. T. (2021). Transfusion and Cellular Therapy in Pediatric Sickle Cell Disease. *Physiology & Behavior*, 176(10), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2020.10.007>.Transfusion
- Zhong, W., Huang, Q., Zeng, L., Hu, Z., & Tang, X. (2019). Caveolin-1 and MLRs: A potential target for neuronal growth and neuroplasticity after ischemic stroke. *International Journal of Medical Sciences*, 16(11), 1492–1503. <https://doi.org/10.7150/ijms.35158>
- Zhou, Z., Behymer, M., & Guchhait, P. (2011). Role of extracellular hemoglobin in thrombosis and vascular occlusion in patients with sickle cell anemia. *Anemia*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/918916>

9.0 ANEXOS

9.1 Parecer do comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE CAV-1 E OS NÍVEIS SÉRICOS DE CAVEOLINA-1 COM COMPLICAÇÕES CEREBROVASCULARES EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA

Pesquisador: ANA BEATRIZ LUCAS DE MOURA RAFAEL

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 48566421.3.3001.5195

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Pernambuco -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.108.925

Apresentação do Projeto:

A anemia falciforme (AF) é uma doença hemolítica caracterizada por um quadro inflamatório crônico. A inflamação, adesão dos leucócitos ao endotélio vascular e hemólise, ocasionados pelo evento de falcização dos eritrócitos, podem levar à oclusão de pequenos vasos contribuindo para a ocorrência de complicações clínicas, como o Acidente Vascular encefálico (AVE). O exame de Doppler Transcraniano (DTC) é utilizado para avaliar o risco do acometimento pelo AVE em pacientes com AF e dada suas limitações, atualmente, emergiu uma necessidade de identificação de novos marcadores genéticos que possam auxiliar o DTC na estratificação de risco dos pacientes. Com isto, este projeto tem como objetivo investigar, em 300 pacientes pediátricos (2 – 18 anos) com AF acompanhados pelo HEMOPE, a associação de complicações cerebrovasculares com polimorfismos no gene CAV-1 (rs3807989, rs7804372 e rs1997623), e os níveis da proteína codificada por este gene, a caveolina -1. Esta proteína está envolvida em vários processos relacionados a fisiopatologia da AF e do AVE, podendo, portanto, ser uma importante molécula de valor prognóstico.

9.2 Termo de Assentimento livre e esclarecido – menores de idade

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PARA MENORES DE 7 a 18 ANOS)

OBS: Este Termo de Assentimento para o menor de 7 a 18 anos não elimina a necessidade da elaboração de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que deve ser assinado pelo responsável ou representante legal do menor.

Convidamos você _____, após autorização dos seus pais [ou dos responsáveis legais] para participar como voluntário (a) da pesquisa: "Investigação da associação de polimorfismos no gene cav-1 e os níveis séricos de caveolina-1 com complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com anemia falciforme". Esta pesquisa é da responsabilidade do (a) pesquisador (a) Ana Beatriz Lucas de Moura Rafael (Endereço: Rua Prof. Augusto Lins e Silva, 668, apto.803, Setúbal, Recife - PE, CEP: 51030030 – Fone: (81) 997842214 – e-mail: anabeatrizlmr12@gmail.com).

Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo (Telefone para contato: 81 99800-9382), Dr. Aderson da Silva Araújo (Telefone para contato: 81 99976-5136) e Dr. Igor de Farias Domingos (Telefone para contato: 81 99609-5839) e está sob a orientação do Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra Telefone: (81) 99800-8105 e-mail macebezerraufpe@gmail.com.

Você será esclarecido (a) sobre qualquer dúvida com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via deste termo lhe será entregue para que seus pais ou responsável possam guarda-la e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu. Para participar deste estudo, um responsável por você deverá autorizar e assinar um Termo de Consentimento, podendo retirar esse consentimento ou interromper a sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo.

Nós verificamos que a anemia falciforme é uma doença de grande incidência que altera os glóbulos vermelhos e que provoca dores, o que pode estar interferindo nas atividades do dia a dia do paciente. Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, este trabalho tem como objetivo a identificação de alterações genéticas na anemia falciforme que permitirá a detecção precoce de complicações clínicas da doença, levando a melhoria do serviço prestado e ao aumento da qualidade de vida dos pacientes.

Dessa forma, gostaríamos que você doasse 8 ml de sangue, obtidos usando agulhas e seringas descartáveis. O risco por nós avaliado para o paciente é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha. Além disso, analisaremos os prontuários feitos pelo médico responsável para obtenção de dados clínicos e laboratoriais que auxiliarão no entendimento das manifestações clínicas.

Esclarecemos que os participantes dessa pesquisa têm plena liberdade de se recusar a participar do estudo e que esta decisão não acarretará penalização por parte dos pesquisadores. Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa como informações coletadas dos prontuários médicos ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos após o término da pesquisa.

Nem você e nem seus pais (ou responsáveis legais) pagarão nada para você participar desta pesquisa, também não receberão nenhum pagamento para a sua participação, pois é voluntária. Se houver necessidade, as despesas (deslocamento e alimentação) para a sua participação e de seus

pais serão assumidas ou ressarcidas pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da sua participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Este documento passou pela aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE que está no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br).**

Assinatura do pesquisador (a)

ASSENTIMENTO DO (DA) MENOR DE IDADE EM PARTICIPAR COMO VOLUNTÁRIO(A)

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____ (se já tiver documento), abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Investigação da associação de polimorfismos no gene cav-1 e os níveis séricos de caveolina-1 com complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com anemia falciforme”, como voluntário (a). Fui informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, o que vai ser feito, assim como os possíveis riscos e benefícios que podem acontecer com a minha participação. Foi-me garantido que posso desistir de participar a qualquer momento, sem que eu ou meus pais precise pagar nada.

Local e data _____

Assinatura do (da) menor : _____

Presenciamos a solicitação de assentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do/a voluntário/a em participar. 02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

9.3 Termo de Assentimento livre e esclarecido - Responsáveis

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PARA RESPONSÁVEL LEGAL PELO MENOR DE 18 ANOS)

Solicitamos a sua autorização para convidar o (a) seu/sua filho (a) _____ (ou menor que está sob sua responsabilidade) para participar, como voluntário (a), da pesquisa estudo "Investigação da associação de polimorfismos no gene cav-1 e os níveis séricos de caveolina-1 com complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com anemia falciforme". Esta pesquisa é da responsabilidade do (a) pesquisador (a) Ana Beatriz Lucas de Moura Rafael (Endereço: Rua Prof. Augusto Lins e Silva, 668, apto.803, Setúbal, Recife - PE, CEP: 51030030 – Fone: (81) 997842214 – e-mail: anabeatrizlrmr12@gmail.com). Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo (Telefone para contato: 81 99800-9382), Dr. Aderson da Silva Araújo (Telefone para contato: 81 99976-5136) e Dr. Igor de Farias Domingos (Telefone para contato: 81 99609-5839) e está sob a orientação do Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra Telefone: (81) 99800-8105 e-mail macbezerraufpe@gmail.com.

O/a Senhor/a será esclarecido (a) sobre qualquer dúvida a respeito da participação dele/a na pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e o/a Senhor/a concordar que o (a) menor faça parte do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias.

Uma via deste termo de consentimento lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável. O/a Senhor/a estará livre para decidir que ele/a participe ou não desta pesquisa. Caso não aceite que ele/a participe, não haverá nenhum problema, pois desistir que seu filho/a participe é um direito seu. Caso não concorde, não haverá penalização para ele/a, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

Nós verificamos que a anemia falciforme é uma doença de grande incidência que altera os glóbulos vermelhos e que provoca dores, o que pode estar interferindo nas atividades do dia a dia do paciente. Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, este trabalho tem como objetivo a identificação de alterações genéticas na anemia falciforme que permitirá a detecção precoce de complicações clínicas da doença, levando a melhoria do serviço prestado e ao aumento da qualidade de vida dos pacientes.

Dessa forma, gostaríamos que seu/sua filho (a) doasse 8 ml de sangue, obtidos usando agulhas e seringas descartáveis. O risco por nós avaliado para o paciente é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha. Além disso, analisaremos os prontuários feitos pelo médico responsável para obtenção de dados clínicos e laboratoriais que auxiliarão no entendimento das manifestações clínicas.

Esclarecemos que os participantes dessa pesquisa têm plena liberdade de se recusar a participar do estudo e que esta decisão não acarretará penalização por parte dos pesquisadores. Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa como informações coletadas dos prontuários médicos ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos após o término da pesquisa.

O (a) senhor (a) não pagará nada e nem receberá nenhum pagamento para ele/ela participar desta pesquisa, pois deve ser de forma voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação dele/a na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento com transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, o (a) senhor (a) poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – Prédio do CCS - 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br).**

Assinatura do pesquisador (a)

CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PARA A PARTICIPAÇÃO DO/A VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, responsável por _____, autorizo a sua participação no estudo “Investigação da associação de polimorfismos no gene cav-1 e os níveis séricos de caveolina-1 com complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com anemia falciforme” como voluntário(a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação dele (a). Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de seu acompanhamento/assistência/tratamento) para mim ou para o (a) menor em questão.

Local e data _____

Assinatura do (da) responsável: _____

Impressão

Digital

(opcional)

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar. 02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

9.4 Tabela suplementar 1

Tabela suplementar 1: p-valor no modelo de herança codominante para os SNPs rs7804372 e rs3807989.

Características clínicas e laboratoriais	p-valor rs7804372	p-valor rs3807989
HbF (%)	0,146	0,303
RBC ($\times 10^{12}/\text{MI}$)	0,880	0,259
Hb (g/dL)	0,970	0,164
Ht (%)	0,646	0,052
VCM (fL)	0,124	0,539
HCM (g/dL)	0,397	0,740
WBC ($\times 10^6/\text{L}$)	0,931	0,281
PLQ ($\times 10^9/\text{L}$)	0,645	0,175
Reticulócitos (%)	0,448	0,996
LDH (U/L)	0,199	0,252
BT (mg/dL)	0,403	0,327
BI (mg/dL)	0,170	0,504
Sexo	0,349	0,380
DTC	0,181	0,109*
AVC	0,153	0,638
DCV	0,499	0,599
FRAVC	0,060	0,449
OUTRAS COMPLICAÇÕES	0,580	0,935

10. Curriculum Lattes

Ana Beatriz Lucas de Moura Rafael

- Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2631453246522146>
- ID Lattes: **2631453246522146**

Formação acadêmica/titulação

2020

Mestrado em andamento em Genética (Conceito CAPES 4).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
 Título: Investigação da associação de polimorfismos no gene CAV-1 e os níveis séricos de caveolina-1 com complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com anemia falciforme..
 Orientador:  Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra.
 Coorientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo.
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
 Grande área: Ciências Biológicas
 Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica /
 Especialidade: Hematologia.

2021

Especialização em andamento em Hematologia Clínica e Laboratorial (NHCL).
 (Carga Horária: 540h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

2016 - 2019

Graduação em Biomedicina.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
 Título: Análise da associação do polimorfismo rs284875 no gene TGFBR3 no desenvolvimento de doença cerebrovascular em pacientes pediátricos com anemia falciforme.
 Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra.

2000 - 2015

Ensino Médio (2º grau).
 Colégio Imaculado Coração de Maria, CICM, Brasil.

Formação Complementar

2019 - 2019

IV CURSO 1.000 LÂMINAS CITOLOGIA HEMATOLÓGICA AVANÇADA. (Carga horária: 20h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

2019 - 2019

(Monitoria) V CURSO 1.000 LÂMINAS CITOLOGIA HEMATOLÓGICA AVANÇADA.

(Carga horária: 20h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

2019 - 2019

IV CURSO DE LÍQUIDOS BIOLÓGICOS. (Carga horária: 20h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

2019 - 2019

VII CURSO DE INTERPRETAÇÃO DO HEMOGRAMA. (Carga horária: 25h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

2019 - 2019

(Monitoria) Pós graduação em Hematologia Clínica e Laboratorial - Turma 4b.

(Carga horária: 540h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

2018 - 2018

I CURSO DE IMUNOHEMATOLOGIA LABORATORIAL. (Carga horária: 20h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

2018 - 2018

III CURSO DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DA HEMOSTASIA. (Carga horária: 20h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

2017 - 2017

I Curso de Inverno em Bioinformática da UFPE. (Carga horária: 40h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

2017 - 2017

Minicurso Práticas em qPCR. (Carga horária: 7h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

Atuação Profissional

2020 - 2020

Vínculo: Convidado, Enquadramento Funcional: Ministrante, Carga horária: 16

Ministrante do Minicurso de Flebotomia na XXVI Semana de Biomedicina da UFPE. Totalizando uma carga horária de 16 horas.

2019 - 2019

Vínculo: Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Aluno Voluntário, Carga horária: 20

Iniciação Científica Voluntária no laboratório de Hematologia e Biologia Molecular da UFPE com ênfase em polimorfismos genéticos relacionados ao AVC em pacientes com anemia falciforme, sob orientação do professor Marcos André Cavalcanti Bezerra.

2018 - 2019

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitoria, Carga horária: 12

Monitoria na disciplina de Exames Hematológicos pelo Departamento de Biofísica e Radiobiologia (CB-UFPE) para o curso de Biomedicina sob orientação dos Professores Marcos André Cavalcanti Bezerra e Antonio Roberto Lucena de Araujo.

2018 - 2019

Vínculo: Estágio extracurricular, Enquadramento Funcional: Aluno Voluntário, Carga horária: 20

Participou como estagiária voluntária no Laboratório de Hematologia e Biologia Molecular do Laboratório Central (LabCen) do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob supervisão do Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra. Totalizando Carga Horária de 1.440 horas.

2018 - 2018

Vínculo: Monitoria, Enquadramento Funcional: Monitoria, Carga horária: 12

Monitoria na disciplina de Urinálises e Fluidos Biológicos pelo Departamento de Biofísica e Radiobiologia (CB-UFPE) para o curso de Biomedicina sob orientação da Profa. Dra. Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes.

Projetos de extensão

2019 - 2019

Liga Acadêmica de Hematologia Clínica e Laboratorial - LHCL

Descrição: Membro fundador e atual diretora da Liga Acadêmica de Hematologia Clínica e Laboratorial (LHCL). A LHCL é uma projeto que utilizará integralmente seu patrimônio com o objetivo aprimorar o aproveitamento acadêmico na área das hematologia clínica e laboratorial por meio das atividades de ensino, pesquisa e extensão. A LHCL é um projeto com tempo de duração indeterminado, formada por acadêmicos e professores de Biomedicina, podendo integrar acadêmicos de qualquer curso da área da saúde da Universidade Federal de Pernambuco, sendo 20% das vagas destinadas a acadêmicos de instituições externas. As atividades da LHCL serão divididas nas seguintes áreas: didática ou de ensino, científica, extensão e laboratorial. Além disso, a LHCL conta com encontros periódicos os quais alternam entre aulas, discussões, intervenções e aplicação prática do conhecimento.

Situação: Concluído; Natureza: Extensão.

Alunos envolvidos: Graduação: (26) .

Integrantes: Ana Beatriz Lucas de Moura Rafael - Integrante / Danízia Menezes de Lima Silva - Integrante / Amanda Moreira Gonçalves de Aguiar - Integrante / Maria Luiza Salustiano Bandeira - Integrante / Dammyres Barboza de Santana Silva - Integrante / Jonathas Emanuel Santos Nogueira - Integrante / Marcos André Cavalcanti Bezerra - Coordenador.