



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências  
Programa de Pós Graduação em Genética

**DANÍZIA MENEZES DE LIMA SILVA**

**Investigação da associação de polimorfismos nos genes *MMP2* e *MMP9* com complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com anemia falciforme**

Recife

2023

**DANÍZIA MENEZES DE LIMA SILVA**

**Investigação da associação de polimorfismos nos genes *MMP2* e *MMP9* 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<sup>o</sup> Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo

Coorientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Igor Farias Domingos

Recife

2023

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Silva, Danízia Menezes de Lima.

Investigação da associação de polimorfismos nos genes MMP2 e MMP9 com complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com anemia falciforme. / Danízia Menezes de Lima Silva. – 2023.

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

Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra.

Coorientador: Antônio 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. Doença cerebrovascular. 4. MMP2. 5. MMP9. I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti. (Orient.). II. Araújo, Antônio Roberto Lucena de. (Coorient.). III. Domingos, Igor Farias. (Coorient.). IV. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-103

**DANÍZIA MENEZES DE LIMA SILVA**

**Investigação da associação de polimorfismos nos genes *MMP2* e *MMP9* 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.

Aprovado em 31/03/2023

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra  
(Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Will de Barros Pita  
(Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer  
(Examinador externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Pedro Luiz de França Neto  
(Examinador externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2023

A mim mesma, como lembrança da minha resiliência e as pessoas que mais admiro em vida: Meu pai Alúzio, minha Mãe Marineuza e minha irmã Dinara.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a instituição de ensino UFPE e ao PPGG pela oportunidade de crescimento profissional, ao CNPq por ter proporcionado subsídio financeiro o qual me proporcionou a permanência e conclusão dos meus objetivos dentro do curso. Ao HEMOPE pela disponibilidade e estrutura e aos pacientes que se voluntariaram a participar da pesquisa.

Agradeço aos funcionários e Professores do laboratório Central da do Centro de Biociências UFPE pela estrutura e ensinamentos passados, em especial a Gabriela Arcanjo que não mediu esforços para me guiar durante o meu percurso.

Aos meus pais, Aluízio e Marineuza por sempre me apoiarem e por serem o as pessoas mais fortes, corajosas, dedicadas e amorosas que um dia poderei conhecer. A minha irmã Dinara, pelo infinito companheirismo e pela sua compreensão e paciência. Nunca serei capaz de mensurar a quão grata sou a todos vocês.

Acredito que nós só somos o que somos pelas pessoas que estão conosco em todos os momentos, aqueles que nos seguram a mão e nos guiam através das dificuldades. Por isso agradeço imensamente à minha rede de apoio de amigos e companheiro que tornaram tudo isso possível; Malu, Gabriel, Élide e Galindo. Sem vocês não teria concluído todo esse percurso.

Agradeço mais que especialmente e infinitamente a minha amiga Ana Beatriz Moura que esteve comigo desde o começo compartilhando não apenas as experiências como também os medos, as frustrações e as lágrimas. Mais do que isso compartilhamos também os sorrisos, as alegrias e agora finalmente o orgulho de termos chegado até aqui da mesma forma que começamos tudo: de mãos dadas. Palavras jamais conseguiriam mensurar tudo o que vivemos e sentimos e o tamanho da minha gratidão. Sem você jamais teria chegado até aqui. Obrigada.

Liberta a tua mente pra ela não desandar  
Lembra que é valente como as águas do mar  
Que é tapete de serpente que dão pra nós pisar  
Andai com passo firme que é pra não bambear  
Quem eles pensam que são pra te apontar?  
Não sabem da tua luta, não entendem seu linguajar  
Que haja flor no seu caminho e no meu caminhar  
Que a felicidade possa estar no olhar.

(Valente – Mc Tha)

## RESUMO

As metaloproteinases de matriz 2 e 9, são responsáveis pela remodelação da matriz extracelular além de estarem diretamente relacionadas com processos inflamatórios e de caráter neurológico, o que as coloca como grandes candidatas a moduladoras da fisiopatologia da anemia falciforme (AF), em especial das complicações de caráter cerebrovascular. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência e possível associação dos polimorfismos nos genes *MMP2* e *MMP9* com o desenvolvimento de complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com AF. No estudo foram incluídos 364 pacientes pediátricos entre 2 e 20 anos (mediana de idade de 14 anos) acompanhados na fundação HEMOPE, e foi realizada a genotipagem para os polimorfismos rs243865 do gene *MMP2* e rs17576 do gene *MMP9* por meio de PCR em tempo real com sondas TaqMan®. Nenhuma associação foi observada entre o polimorfismo rs243865 com as complicações cerebrovasculares e variáveis laboratoriais analisadas no estudo. Já em relação ao polimorfismo rs17576 não foram observadas associações com as complicações cerebrovasculares em questão, mas foi observada uma associação com as variáveis laboratoriais: número de células vermelhas (RBC)  $p=0,032$ , bilirrubina total (BT)  $p=0,003$  e bilirrubina indireta  $p=0,007$  nos trazendo hipóteses sobre uma possível participação da *MMP9* com o perfil hemolítico da doença. De forma geral, a influência de ambos os genes quanto ao desenvolvimento das complicações cerebrovasculares na AF precisam ser melhores investigados em diferentes populações.

**Palavras-chave:** Anemia Falciforme, AVC, Doença cerebrovascular, *MMP2*, *MMP9*.

## ABSTRACT

Matrix metalloproteinases 2 and 9 are responsible for remodeling the extracellular matrix, as well as being directly related to inflammatory and neurological processes, which makes them great candidates for modulators of the pathophysiology of sickle cell anemia (SCA), in particular the cerebrovascular complications. This study aimed to evaluate the influence and possible association of polymorphisms in the MMP2 and MMP9 genes with the development of cerebrovascular complications in pediatric patients with SCA. The study included 364 pediatric patients aged between 2 and 20 years (median age 14 years) accompanied at the HEMOPE foundation, and genotyping was performed for polymorphisms rs243865 of the MMP2 gene and rs17576 of the MMP9 gene by means of real-time PCR with TaqMan® probes. No association was observed between the rs243865 polymorphism with the cerebrovascular complications and laboratory variables analyzed in the study. Regarding the rs17576 polymorphism, no associations were observed with the cerebrovascular complications in question, but an association was observed with the laboratory variables: number of red cells (RBC)  $p=0.032$ , total bilirubin (BT)  $p=0.003$  and indirect bilirubin  $p=0.007$ , bringing us hypotheses about a possible participation of MMP9 with the hemolytic profile of the disease. In general, the influence of both genes on the development of cerebrovascular complications in SCA needs to be better investigated in different populations.

**Keywords:** Sickle Cell Anemia, Stroke, Cerebrovascular Disease, MMP2, MMP9.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Mapa com a estimativa de crianças com AF entre 100.000 nascimentos em 2015.....	18
<b>Figura 2:</b> Principais eventos envolvidos na fisiopatologia da anemia falciforme ..	20
<b>Figura 3:</b> Modelo de sobreposição dos sub-fenótipos da AF .....	23
<b>Figura 4:</b> Diagrama de realização do DTC .....	26
<b>Figura 5:</b> Algoritmo de estratificação do DTC .....	28
<b>Figura 6:</b> Diferentes estruturas das metaloproteínas de matriz.....	33
<b>Figura 7:</b> Representação da estrutura molecular geral das metaloproteínas ...	34
<b>Figura 8:</b> Localização e interações entre os inibidores teciduais das metaloproteínas (TIMP's) e as MMP's .....	35
<b>Figura 9:</b> Região promotora de Região promotora de MMP-2 e MMP-9 com os sítios de ligação de seus fatores de transcrição .....	37
<b>Quadro 1:</b> Protocolo padrão para realização de amplificação por qPCR.....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo .....	44
<b>Tabela 2:</b> Características clínicas dos pacientes incluídos no estudo .....	45
<b>Tabela 3:</b> Frequência alélica e genotípica dos SNP estudado na população .....	46
<b>Tabela 4:</b> Comparação do polimorfismo rs243865 na população estudada .....	46
<b>Tabela 5:</b> Comparação do polimorfismo rs17576 na população estudada .....	48
<b>Tabela 6:</b> Comparação da prevalência das complicações cerebrovasculares em relação aos polimorfismos e seus respectivos genótipos .....	49

## LISTA DE ABREVIACOES , SIGLAS E SIMBOLOS

<b>Item</b>	<b>Definição</b>
$\alpha$	Alfa
$\alpha$ 3,7kb	Deleção $\square$ 3.7kb
$\beta$	Beta
$\beta$ S	Cadeia globínica beta com alteração para a formação da Hb S
$\gamma$	Gama
1,25(OH)2D	1,25-diidroxivitamina D
25(OH)D	25-hidroxivitamina D
7-DHC	7-dehidrocolesterol
AF	Anemia Falciforme
ARB	rabe-Indiano
AVC	Acidente vascular cerebral
BEN	Benin
BHE	Barreira Hematoencefálica
BI	Bilirrubina indireta
BT	Bilirrubina total
CAR	República Central Africana
CDX-2	Fator de transcrição homeobox 2 tipo caudal
CSSCD	do inglês, Cooperative study of sickle cell disease
CVO	Crise vaso-oclusiva
DBP	Do inglês, Vitamin D binding protein
DCV	Doença cerebrovascular
DF	Doença falciforme
DMO	Densidade mineral óssea
DTC	Doppler transcraniano
EDTA	cido etilenodiaminotetracético
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
ET-1	Endotelina-1

FGF-23	Fator de crescimento fibroblástico 23
GWAS	do inglês, Genome-Wide Association Study
Hb A	Hemoglobina A
Hb AS	Indivíduo traço falciforme
Hb F	Hemoglobina Fetal
Hb S	Hemoglobina S
Hb S/ $\beta^0$	S/ $\beta^0$ talassemia
HBB	Gene da $\beta$ globina
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HU	Hidroxiuréia
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1
LabCen	Laboratório Central
LDH	Lactato desidrogenase
mRNA	RNA mensageiro
MMP2	Metaloproteinase de matriz 2
MMP9	Metaloproteinase de matriz 9
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
PTH	Paratormônio
q	Braço longo do cromossomo
RBC	do inglês, <i>Red blood cells</i>
RFLP	do inglês, <i>Restriction fragment length polymorphism</i>

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>15</b>
<b>2. Fundamentação Teórica</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Anemia Falciforme</b> .....	<b>17</b>
2.1.1 Etiologia e Epidemiologia .....	17
2.1.2 Fisiopatologia .....	19
2.1.3 Complicações Clínicas .....	22
2.1.4 Complicações Cerebrovasculares .....	23
<b>2.2 Detecção E Tratamento Da Doença Cerebrovascular Falciforme</b> .....	<b>25</b>
2.2.1 Doppler Transcraniano .....	25
2.2.2 A terapia de transfusão e a Hidroxiureia.....	28
<b>2.3 Moduladores Genéticos</b> .....	<b>31</b>
<b>2.4 A fisiopatologia das Metaloproteinases de Matriz</b> .....	<b>32</b>
2.4.1 As Metaloproteinases de Matriz 2 e 9: atividade e expressão .....	36
2.4.2 As Metaloproteinases de Matriz 2 e 9: polimorfismos e complicações neurológicas.....	37
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2 Objetivo Específico</b> .....	<b>39</b>
<b>4. Materiais E Métodos</b> .....	<b>40</b>
4.1 Desenho Do Estudo .....	40
4.2 Definição dos Grupos .....	40
<b>4.3 Aspectos Éticos Da Pesquisa</b> .....	<b>41</b>
<b>4.4 Coleta Dos Dados Clínicos E Laboratoriais</b> .....	<b>42</b>
<b>4.5 Análise Molecular</b> .....	<b>42</b>
4.5.1 Extração De DNA Genômico .....	42
4.5.2 Genotipagem dos polimorfismos dos genes <i>MMP2</i> e <i>MMP9</i> .....	42
<b>4.6 Análise Estatística</b> .....	<b>43</b>
<b>5. Resultados</b> .....	<b>44</b>
5.1 Caracterização Da Coorte .....	44
<b>5.2 Genotipagem dos SNPS dos genes <i>MMP2</i> e <i>MMP9</i></b> .....	<b>45</b>
<b>5.3 Associação dos polimorfismos nos genes <i>MMP2</i> e <i>MMP9</i> com complicações cerebrovasculares e variáveis laboratoriais</b> .....	<b>46</b>

<b>6. Discussão .....</b>	<b>50</b>
<b>7. Conclusões.....</b>	<b>55</b>
<b>8. Referências.....</b>	<b>56</b>
<b>9. Anexo I.....</b>	<b>63</b>
<b>Anexo II.....</b>	<b>64</b>
<b>10. Currículo Lattes.....</b>	<b>68</b>

## 1. Introdução

A anemia falciforme (AF) é a doença monogênica mais comum no mundo, causada pela herança em homozigose de uma mutação de ponto no gene da  $\beta$  globina (HBB), caracterizada pela substituição da base nitrogenada adenina para timina o que leva a uma mudança de aminoácido no 6º códon de ácido glutâmico para valina (HBB;  $\beta$ S GAG→GTG; glu6val), o que resulta na formação de uma hemoglobina variante intitulada de hemoglobina S (Hb S). A HbS, diante de algumas condições como a hipóxia e alteração de pH, se polimeriza e acarretando alterações na morfologia eritrocitária, levando ao processo de falcização. A AF é caracterizada, em especial, pelo quadro inflamatório crônico e fenômenos vaso-oclusivos na microcirculação que levam a infartos isquêmicos em diversos órgãos e tecidos do indivíduo e isso acontece principalmente devido a menor sobrevivência dos eritrócitos na circulação e maior adesão de leucócitos, plaquetas e hemácias ao endotélio vascular. A ocorrência desses eventos compõe um cenário fisiopatológico que tem um papel crucial na origem das complicações clínicas da doença.

As principais complicações clínicas que acometem os pacientes com AF são crises algicas, úlceras de membros inferiores, síndrome torácica aguda, sequestro esplênico, osteonecrose, insuficiência renal crônica, priapismo, dactilite e complicações cerebrovasculares como o acidente vascular cerebral (AVC), sendo esse mais comum em pacientes pediátricos, isso porque crianças com AF possuem um risco 300x maior de desenvolver AVC do que aquelas com perfil de hemoglobina normal (HbAA).

O Doppler Transcraniano (DTC) é um exame de ultrassonografia não invasivo que determina a velocidade do fluxo sanguíneos nas artérias cerebrais, identificando através da velocidade obtida o risco de desenvolvimento de AVC. O risco de AVC é diretamente proporcional ao aumento da velocidade média das artérias tornando o DTC uma ferramenta de detecção precoce dessa vasculopatia. Por outro lado, o AVC é um evento multifatorial tendo a sua fisiopatologia na AF ligada a diversos mecanismos como por exemplo o aumento de expressão de moléculas de adesão endotelial que irão contribuir para a maior aderência das células levando a um estado mais susceptível a oclusão do vaso.

Apesar de ser uma doença monogênica, os pacientes com AF manifestam uma grande heterogeneidade quanto ao seu curso clínico, em especial no desenvolvimento das complicações cerebrovasculares. Dessa forma, se faz necessário e importante a investigação de marcadores genéticos que estejam envolvidos com a fisiopatologia da doença e que podem possivelmente auxiliar na detecção e compreensão da susceptibilidade de indivíduos portadores de AF quanto à proteção ou risco do desenvolvimento dessas complicações clínicas.

As metaloproteinases de matriz (MMP) são uma família de enzimas proteolíticas com diferentes substratos e diferentes localizações. A função proteolítica que as MMP's exercem sobre a matriz extracelular é essencial para diversos processos fisiológicos como, angiogênese, remodelação e reparo tecidual, além de estarem envolvidas, também, com processos inflamatórios, proliferação e diferenciação celular. Diante disso, os genes das metaloproteinases de matriz 2 e 9 (*MMP2* e *MMP9*) são importantes candidatos para estudos de associação por já serem relatadas com participação em processos inflamatórios de forma geral, em especial, os seus respectivos polimorfismos rs243865 e rs17576 com complicações clínicas como câncer de mama, síndrome do ovário policístico, diabetes tipo 2, como também complicações cerebrovasculares e neurológicas.

Apesar dos estudos de associação envolvendo o AVC com os genes da MMP 2 e 9, e da influência e participação dos níveis das suas respectivas metaloproteinases com essa complicação, pouco se sabe sobre essa relação em pacientes com AF. Sendo assim, sabendo da ampla expressão tecidual de ambos os genes (em especial células da micróglia, células dendríticas, fibroblastos e leucócitos) e da sua já relatada participação em distúrbios neurológicos, acredita-se que polimorfismos nesses genes podem estar associado ao desenvolvimento da fisiopatologia cerebrovascular em pacientes com AF, contribuindo ou não para o curso clínico da doença no indivíduo portador.

## 2. Fundamentação Teórica

### 2.1 Anemia Falciforme

#### 2.1.1 Etiologia e Epidemiologia

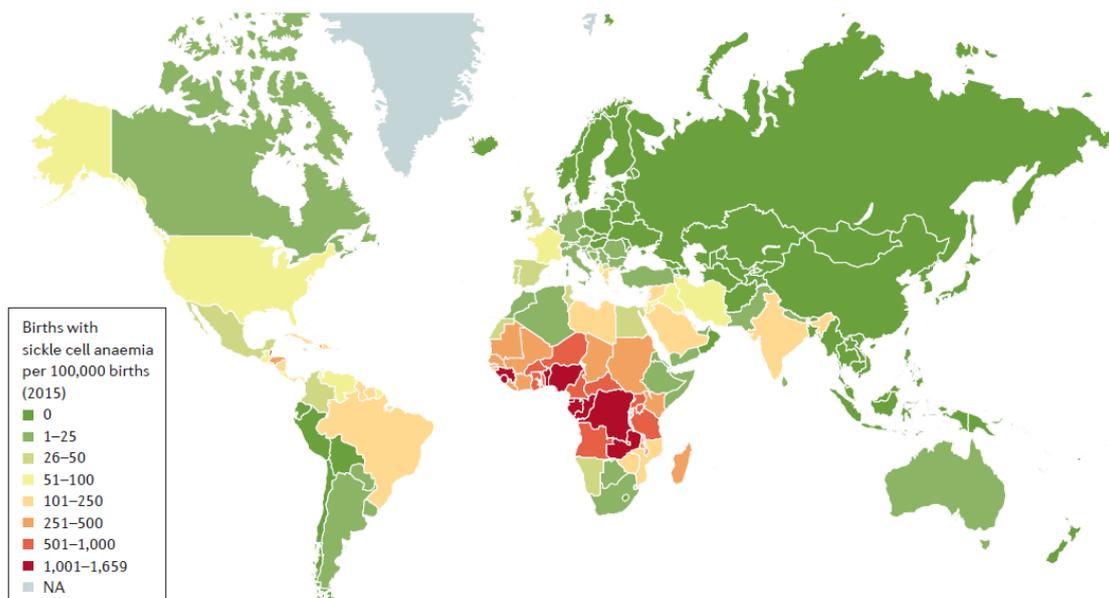
A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia autossômica recessiva caracterizada pela herança em homozigose de uma mutação no gene que codifica a cadeia globínica  $\beta$  localizado no cromossomo 11p15.15 que origina a hemoglobina S (HbS). A alteração molecular da AF consiste na substituição da base adenina por timina no sexto códon do gene HBB, levando à troca de um resíduo hidrofílico de ácido glutâmico por um resíduo hidrofóbico de valina (HBB;  $\beta$ S GAG→GTG; glu6val) (Nembaware et al., 2020). Devido a mudança dos resíduos de aminoácidos, as hemácias que possuem a HbS apresentam um formato diferente do usual (bicôncavo) muito característico semelhante a uma foice, tendo sido detectada pela primeira vez em um jovem com descendência africana em 1910 (Herrick 1910; Ferrone 2018).

Enquanto a herança em homozigose da HbS caracteriza a anemia falciforme, existe ainda também o termo doença falciforme (DF), que consiste em todo o grupo de hemoglobinopatias que apresentam a HbS em interação também com outras hemoglobinas variantes. Alguns indivíduos podem também herdar a mutação em heterozigose (HbAS), dessa forma eles são assintomáticos e apresentam uma condição intitulada como traço falciforme (Steinberg 2008; Inusa et al. 2019).

A AF é considerada a doença monogênica mais comum do mundo e segundo o estudo de Carga Global de Doença (Global Burden of Disease - GBD), 3.2 milhões de pessoas vivem com DF, 43 milhões de pessoas são portadoras do traço falciforme e 176,000 pessoas morrem por ano devido a complicações decorrentes da doença (GBD Mortal. Causes Death Collab. 2015). Além de ser, também, considerada a doença hereditária com maiores riscos de sobrevida do mundo acometendo principalmente populações com ancestralidade Africana, Árabe e Indiana. A frequência da mutação em diferentes regiões do mundo difere principalmente devido a influência de fatores de desenvolvimento social como movimentos migratórios populacionais, além da proteção contra a malária proporcionada pela heterozigose para a HbS (HbAS). Por esse fator é possível notar a maior prevalência em algumas regiões da América Latina como o Brasil. Estima-se que a frequência de herança no oeste africano é 1 a cada 3 - 4 indivíduos, quando comparado a 1 a cada 400

indivíduos afro-americanos. A frequência no continente europeu é variada de acordo com o padrão migratório da região em questão, no Reino Unido, por exemplo, estima-se que em torno de 14.000 indivíduos sejam portadores da doença (Inusa et al., 2019; Nembaware et al., 2020) (Figura 1).

Segundo a Organização Mundial da Saúde aproximadamente 300.000 indivíduos nascem com AF no mundo, sendo cerca de 237.381 na região Africana e cerca de 11.143 na região Americana. Estima-se que a prevalência de indivíduos nascidos com AF é de 1:16.305 nos Estados Unidos, 1:14.189 na Costa Rica, 1:5.627 na Venezuela enquanto que no Brasil essa prevalência é de 1:1000. No total estima-se que no Brasil cerca de 30.000 indivíduos possuam a AF enquanto que cerca de 7 milhões sejam portadores do traço falciforme (HbAS) (Cançado e Jesus, 2007; Pompeo et al., 2022). No estado de Pernambuco, um em cada 23 recém-nascidos vivos possui o traço falciforme e um em cada 7.000 nasce com a doença falciforme (Brasil, 2013). Bandeira e cols. (2008), ao realizarem uma triagem em sangue de cordão umbilical em uma amostra com alto percentual de indivíduos declarados afrodescendentes, encontraram uma frequência de 5,1% do traço falciforme em recém nascidos acompanhados em uma maternidade pública no estado de Pernambuco.



**Figura 1:** Estimativa de crianças com AF entre 100.000 nascimentos em 2015. (Kato, 2018)

### 2.1.2 Fisiopatologia

As complicações clínicas da AF são causadas pela presença das moléculas de HbS que apresentam propriedades bioquímicas onde, em situações de desoxigenação, estabelecem interações intermoleculares de caráter hidrofóbico, que irão promover a sua polimerização, levando a uma série de alterações na morfologia e funcionalidade dos eritrócitos (Hebbel; Belcher; Vercellotti, 2020). Esse fenômeno é intitulado falcização e recebe esse nome pelo formato característico de foice/fusiforme que as hemácias adquirem após a polimerização. A polimerização e a despolimerização acontecem de forma cíclica até que causam danos irreversíveis ao citoesqueleto da membrana eritrocitária, dessa forma as células se tornam irreversivelmente falcizadas (Ferrone, 2018; Sundd; Gladwin; Novelli, 2018). Estudos apontam que a formação do polímero é de ordem exponencial em função da concentração de HbS na hemácia, demonstrando a influência desse fator no fenômeno da falcização (Wang; Zennadi, 2021).

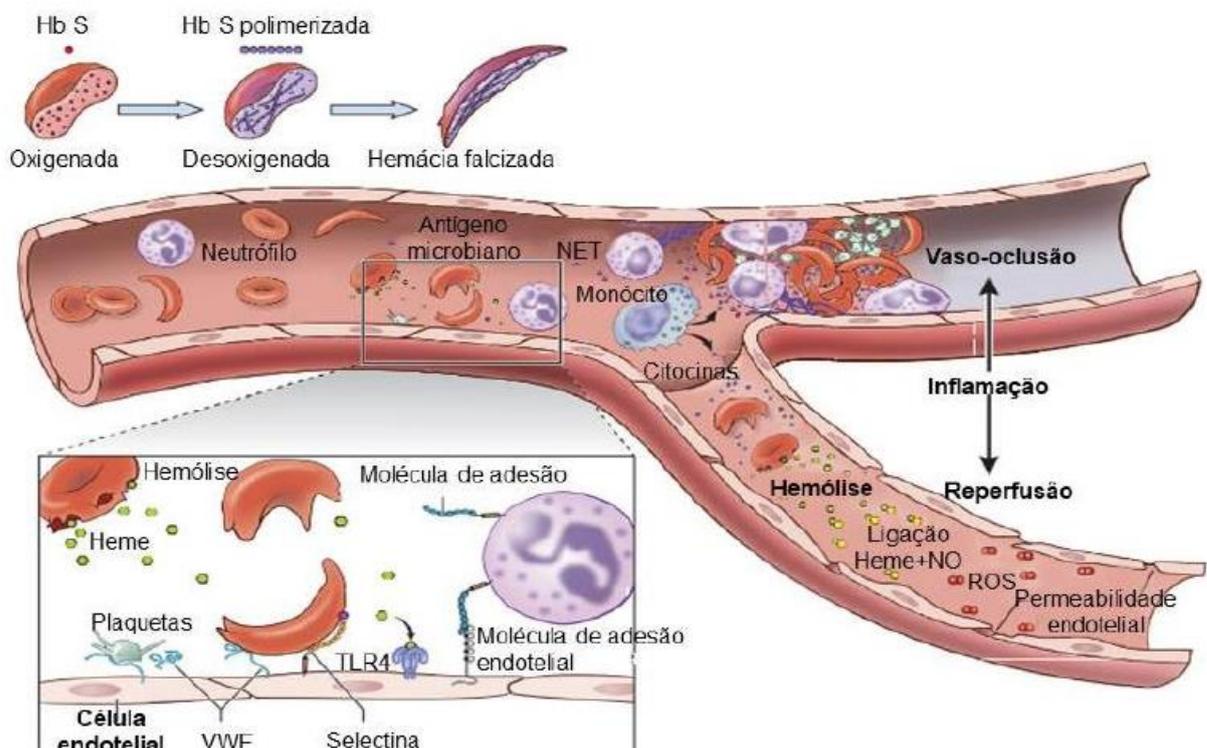
O processo de falcização das hemácias está correlacionado com algumas condições como do grau de desoxigenação da célula, pH, concentração intracelular de Hb fetal (HbF) e temperatura (Kato et al., 2018). As hemácias que contém moléculas de HbS polimerizadas sofrem algumas alterações como a desidratação causada pela redução de água e íons celulares e aumento da densidade do eritrócito que por consequência acelera a formação do polímero (Ferrone, 2018).

A hemácia ao passar pelo processo de falcização, sofre alterações nas propriedades da sua membrana plasmática como o aumento da adesividade e perda da sua flexibilidade que por consequência também leva a perda da sua deformabilidade celular, característica importante para a sua passagem pelos vasos principalmente os de pequeno calibre (microcirculação). Além disso, o acúmulo de polímeros de HbS no interior do eritrócitos também o fragilizam, acarretando em uma constante hemólise intravascular. Todos esses fatores, em conjunto, compõem o fenótipo da anemia falciforme que consiste na vaso-oclusão acompanhada de eventos hemolíticos (Steinberg 2008; Darbari, Sheehan, Ballas, 2020; Rehman et al. 2021).

Outra característica importante manifestada pelas hemácias que contém a HbS é a alteração da composição lipídica da membrana que leva a maior exposição de fosfatidilserina (PS) na monocamada lipídica externa (Ballas, 2018) . Essa alteração

acarreta no aumento da adesão celular ao endotélio e essa maior interação entre hemácias falcizadas e endotélio leva a uma ativação das células endoteliais que acabam por aumentar a produção de moléculas inflamatórias (como as citocinas IL-1, IL-8, IL-6, GM-CSF, inibidor do ativador de plasminogênio (PAI -1)), produzir radicais livres principalmente espécies reativas de oxigênio (EROS) e ativar fatores de transcrição que regulam a expressão de moléculas de adesão como a E-selectina, P-selectina molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1). Além disso, há também o aumento da conversão de pró-trombina em trombina levando ao aumento da taxa de eventos trombóticos (Kato et al. 2018; Hebbel, Belcher, Vercellotti, 2020; Aggeli et al., 2021).

De modo geral, os eventos vaso-oclusivos que ocorrem na AF resultam de um conjunto de fatores que constroem um cenário complexo onde, além da alta adesividade celular e intensa ativação do endotélio, o aumento de leucócitos e plaquetas circulantes na microcirculação também contribuem para a desaceleração circulatória (Allali et al., 2021) .Todo esse cenário produz, então, um ambiente de caráter inflamatório que se retroalimenta positivamente gerando sucessivos eventos oclusivos que acarretam em isquemia e infarto nos tecidos de forma sistêmica (Kato et al. 2018). (Figura 2)



**Figura 2:** Principais eventos envolvidos na fisiopatologia da anemia falciforme. A polimerização da desoxi-HbS leva à formação de eritrócitos desidratados e deformados. As células falcizadas desencadeiam a oclusão microvascular através de interações com neutrófilos e plaquetas ativadas e adesão ao endotélio vascular, levando à isquemia e hipóxia tecidual, seguida por vasodilatação e lesão de reperfusão. Devido à hemólise há liberação de hemoglobina com consequente oxidação pelo heme. O heme funciona como um padrão molecular associado a danos que ativa as células endoteliais, macrófagos e neutrófilos e promove a formação de NETs via ligação TLR4. NET: neutrophil extracellular trap, ROS: Espécies reativas do oxigenio, VWF: fator de von Willebrand, TLR4: receptor do tipo Toll 4 (Adaptado de Williams and Thein 2018).

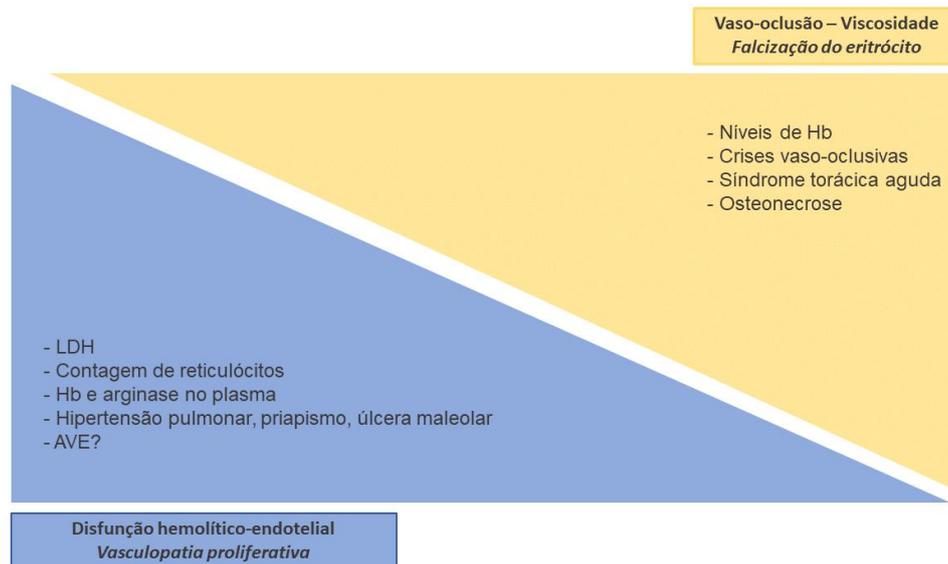
Em paralelo aos eventos oclusivos, a AF também apresenta um quadro de intensa hemólise, isso porque as hemácias falcizadas apresentam um tempo de circulação mais curto devido a fragilidade da sua membrana. Dessa forma, uma grande quantidade de Hb fica livre no plasma promovendo a saturação de sua proteína ligante, a haptoglobina (Hebbel, Belcher, Vercellotti, 2020). As moléculas livres de Hb reagem também sequestrando o óxido nítrico (NO), que é um potente vasodilatador e atua na manutenção do tônus vascular em conjunto com a endotelina-1 (ET-1) e outros mediadores produzidos pelo endotélio (Aggeli et al. 2021). Além da diminuição da biodisponibilidade do NO pela Hb livre, também há, durante a hemólise, a liberação de arginase, enzima que converte a L-arginina em outro metabólito, reduzindo a disponibilidade do principal substrato para a síntese de NO, contribuindo, assim, com o desenvolvimento das complicações clínicas da doença (Ofori-Acquah, 2020; Wang, Zennadi, 2021).

Na AF, a hemólise ocorre extra e intra vascularmente. Na hemólise extra vascular, as hemácias danificadas são reconhecidas pelo sistema reticulo endotelial. Já a hemólise intravascular corresponde a cerca de 30% da hemólise total sofrida por um paciente com AF e isso é devido não só a fragilidade das hemácias mas também ao acúmulo anormal de imunoglobulina G (IgG) na superfície dos eritrócitos levando a destruição intravascular das hemácias mediadas pelo complemento (Azar & Wong, 2017; Rehman et al., 2021). Assim, a vaso-oclusão, em especial na microcirculação, e os eventos hemolíticos compõem um cenário de eventos fisiopatológicos que determinam as complicações clínicas desses pacientes (Onimoe, Rotz, 2020).

### 2.1.3 Manifestações Clínicas

Na AF as complicações clínicas são de caráter bastante heterogêneo, variando de indivíduo para indivíduo além de, também, haver uma predominância de algumas complicações em determinada faixa etária. Estudos sobre essa heterogeneidade levaram o Programa dos Centros de Compreensão da Doença Falciforme, em 2005, a promover uma categorização das complicações clínicas da AF, onde elas são divididas em três grandes grupos que totalizam doze categorias de acordo com o sistema e/ou órgão acometido (Ballas et al. 2010). De modo geral, complicações como crise vaso-oclusiva (CVO), síndrome torácica aguda (STA) e acidente vascular cerebral (AVC) são mais comuns nas primeiras décadas da vida contudo elas ainda podem ocorrer ao longo da vida (Sundd, Gladwin, Novelli, 2018).

Devido a heterogeneidade da doença, um modelo de sobreposição de sub-fenótipos da AF surgiu para explicar a ocorrência das manifestações clínicas nesses indivíduos: um modelo regido pelos princípios "viscosidade - vaso-oclusão" em que indivíduos com maiores níveis de Hb têm mais episódios de falcização, culminando em aderência eritrocitária e vaso-oclusão. Dessa forma, eles apresentariam um sub-fenótipo que envolve complicações como crise de dor, síndrome torácica aguda (STA) e osteonecrose. Já o segundo sub-fenótipo regido pela "hemólise - disfunção endotelial" está relacionado com altos níveis de marcadores hemolíticos como LDH, reticulócitos e arginase produzindo um estado de depleção da disponibilidade NO, prejudicando consequentemente a função vasomotora. Dessa forma há o envolvimento maior de complicações como a hipertensão pulmonar, priapismo, úlceras de membros inferiores e doença cerebrovascular, que inclui complicações como ataque isquêmico transitório, infarto silencioso, Doppler Transcraniano de alto risco e acidente vascular cerebral, sendo esta última a de maior gravidade (Figura 3) (Kato et al., 2018; Ofori-Acquah, 2020).



**Figura 3:** Modelo de sobreposição de sub-fenótipos da AF. Sugere-se que um conjunto de complicações hemolítico-endoteliais, possam influenciar no desenvolvimento de úlceras maleolares, priapismo, hipertensão pulmonar e talvez no AVE. (Adaptado de Kato et al., 2007)

### 2.1.4 Complicações Cerebrovasculares

As complicações cerebrovasculares na AF englobam eventos como o infarto cerebral silencioso, ataque isquêmico transitório, vasculopatias intra e extracranianas e doença cerebrovascular, que consiste na presença de um Doppler Transcraniano (DTC) de alto risco e acidente vascular cerebral (AVC), sendo essa última a complicação de maior gravidade (Hirtz, Kirkham, 2019). De forma geral, as complicações cerebrovasculares são associadas a um comprometimento significativo da qualidade de vida dos pacientes com AF e a uma elevada taxa de morbidade (Aggeli et al., 2021).

O AVC é definido como um evento neurológico agudo secundário à oclusão de uma artéria com consequente isquemia cerebral, podendo ser também um evento de caráter hemorrágico. Em pacientes com a AF, o AVC do tipo isquêmico (AVCI) é o mais comum, sendo responsável por 75% dos casos, e ele geralmente ocorre nas duas primeiras décadas de vida sendo um evento muitas vezes associado a sequelas como disfunção neurológica e/ou motora (Stotesbury et al., 2019). Antes das medidas protetivas estabelecidas, o AVC era responsável por cerca de 20% dos óbitos de pacientes pediátricos com AF, atualmente essa taxa foi reduzida a 10%, no entanto a maioria dos óbitos por AVC são relacionadas ao do tipo hemorrágico (Kirkham; Lagunju, 2021).

Mesmo com a redução das taxas de mortalidade relacionadas ao AVC devido as medidas preventivas já existentes, a prevalência dessa complicação ainda é considerável. Estima-se que cerca de 11% dos pacientes pediátricos com AF são acometidos por pelo menos um evento de AVC até dos 20 anos de idade podendo essa taxa ser de até 17% quando não há a aplicação de nenhuma medida protetiva, nesses casos, quando, mesmo após o AVC, nenhuma medida é tomada, o risco de recorrência é de 75% e geralmente tem a tendência de ocorrer 36 meses após o primeiro evento (Aggeli et al. 2021; Stotesbury et al. 2019; Talha et al., 2022).

Estima-se que uma criança portadora de AF (HbSS) possui 300 vezes mais chances de ser acometida por um AVC do que crianças com padrão de herança de hemoglobinas normal (HbAA), sendo esse risco maior durante a primeira década de vida, mais significativamente entre 2 e 5 anos de idade, não excluindo a prevalência durante toda a infância e segunda década de vida do paciente (Aggeli et al., 2021; Hirtz; Kirkham, 2019b). No entanto, o risco é menor antes dos 2 anos de idade e discute-se que isso provavelmente é devido à influência protetora da HbF nesses pacientes, que atua diminuindo a taxa de falcização sofrida pelas hemácias. (Jang et al., 2021)

Em pacientes com AF, o AVCI geralmente ocorre nas artérias do polígono de Willis, onde as artérias cerebrais médias, cerebrais anteriores e carótida interna são as mais comumente acometidas (Sabarense et al., 2021). Todo o cenário fisiopatológico da AF contribui para o acontecimento do AVCI, como o aumento da adesão eritrocitária, ativação endotelial, aumento da produção de mediadores inflamatórios, adesivos e trombóticos, além da diminuição da produção de mediadores citoprotetores, como o NO e do aumento do estresse oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Aggeli et al., 2021; Hirtz; Kirkham, 2019). A gravidade e extensão do acometimento pelo AVCI é proporcional ao grau de estenose sofrido pelas artérias e ele pode ser designado em dois subtipos; o com manifestações clínicas (hemiparesia, monoparesia, afasia, perda de força, convulsão, distúrbios visuais, deficit de atenção e na função motora), e o silencioso, o qual não possui manifestações claras e também pode ser referido como infarto cerebral silencioso. O AVCI sintomático geralmente está associado a estenose de artérias de maior calibre e essa estenose pode levar a uma condição oclusiva crônica onde há o

desenvolvimento de vasos compensatórios intitulada de síndrome Moya-Moya (Gemel et al., 2022; Ofori-Acquah, 2020; Pompeo et al., 2022).

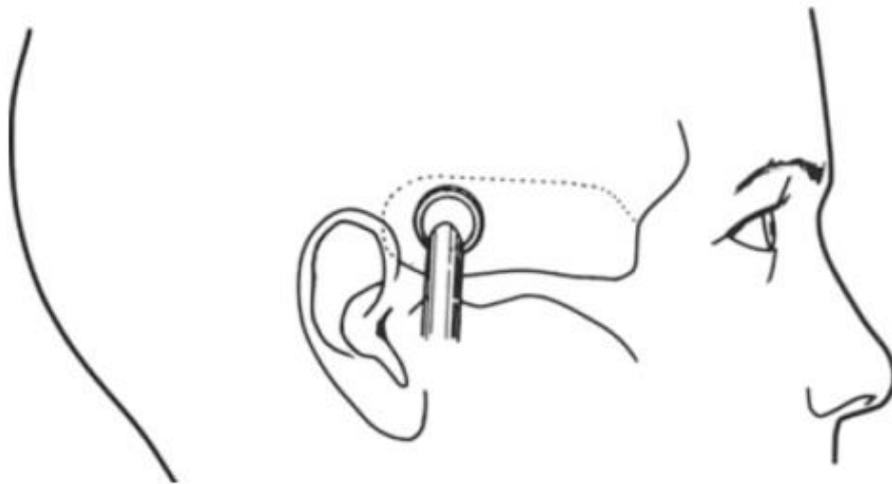
Já os ataques isquêmicos transitórios e infartos cerebrais silenciosos possuem uma prevalência de 25% entre crianças de 4 a 6 anos, e 39% em pacientes pediátricos de até 18 anos podendo atuar, juntamente com outras vasculopatias, como fatores de risco para o desenvolvimento posterior de um AVC (Hirtz; Kirkham, 2019; Stotesbury et al., 2019). A detecção de complicações cerebrovasculares é feita através de exames de imagem como ressonância magnética nuclear (RMN) ou tomografia computadorizada (TC), e, no caso do AVC, o Doppler Transcraniano (DTC) que surgiu como um importante protocolo de estratificação, e, por consequência, prevenção do AVC em pacientes com AF, ele junto com outras medidas protetivas foram responsáveis pela diminuição da taxa de mortalidade desses pacientes (Crow, 2020; Phillips et al., 2021).

## **2.2 Detecção e prevenção da Doença Cerebrovascular na Anemia Falciforme**

### **2.2.1 Doppler Transcraniano**

O Doppler Transcraniano (DTC) é um exame de ultrassonografia não invasivo, indolor e de baixo custo, capaz de estimar a média da velocidade máxima de fluxo (VMMF) sanguíneo nas artérias intracranianas do polígono de Willis (Crow, 2020). No DTC, áreas de estenose, devido ao estreitamento dos vasos, são identificadas pelo aumento do fluxo sanguíneo, dessa forma, a velocidade detectada no exame é diretamente proporcional à velocidade sanguínea e inversamente proporcional ao diâmetro do vaso (Adams et al., 2004; Kija et al., 2019). Para realização do exame, um transdutor é posicionado em uma região craniana de baixa densidade óssea ou em um forame ósseo, a região mais comumente utilizada é temporal, que se localiza acima do arco zigomático e anterior a orelha, recebendo o nome de janela acústica (Figura 4). Dessa forma é possível avaliar a VMMF das artérias cerebral média, bifurcação da artéria carótida interna, carótida interna, cerebral anterior, cerebral posterior e basilar, todas são sempre avaliadas de modo bilateral. (Aaslid; Markwalder; Nornes, 1982).

Os valores da VMMF variam de adultos (60 cm/s) para crianças e de crianças saudáveis (90 cm/s) para aquelas com AF (130-140 cm/s). Após a realização do DTC e a obtenção do seu resultado, os pacientes podem ser estratificados em três grupos distintos: normal, condicionante e alto risco. A VMMF é considerada normal até 170 cm/s, condicionante quando a VMMF é igual ou superior a 170 cm/s até 199 cm/s, e alto risco, quando em duas avaliações seguidas e independentes, as VMMF são iguais ou superiores a 200 cm/s (Adams, Ohene-Frempong, & Wang, 2001; Adams et al., 2004; Debaun et al., 2020).



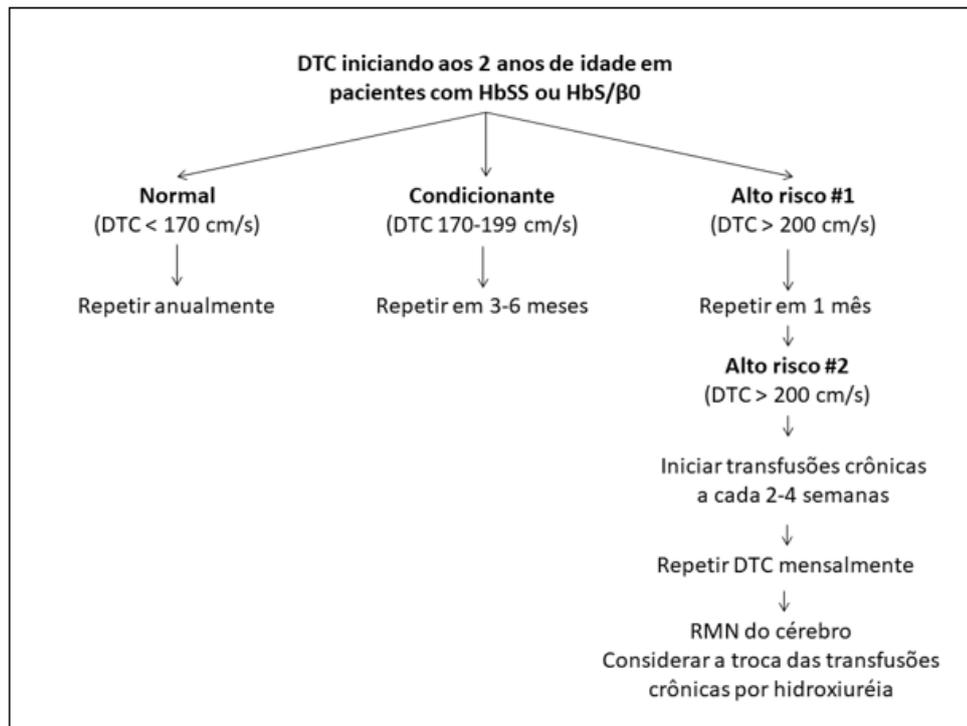
**Figura 4:** diagrama de área onde o transdutor do Doppler Transcraniano é posicionado para obter os sinais das artérias intracranianas (Aaslid et al., 1982).

Adams e cols., em 1997 realizaram um estudo onde 315 crianças com AF, sem histórico de AVC, foram submetidas a exames neurológicos e concluiu-se que o risco de desenvolvimento de AVC aumentava significativamente com o aumento da velocidade sanguínea nas artérias carótida e cerebral média (Adams et al., 1997). Baseado nesse achado, em 1998, também Adams e cols, realizaram o estudo STOP (do inglês, Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia, STOP trial) e propuseram o uso do DTC como uma ferramenta de triagem e estratificação clínica como forma de prevenção primária do AVC em crianças com AF (Hb SS) e S/ $\beta^0$  talassemia (Hb S/ $\beta^0$ ). No estudo, 163 crianças com dois resultados confirmatórios de DTC de alto risco foram separadas em dois grupos onde um dos grupos foi submetido a uma terapia de transfusão administrada a cada 3-5 semanas, onde o principal objetivo era diminuir a quantidade de HbS para menos que 30%, nesse grupo, notou-se que o risco de desenvolvimento de AVC diminuiu em cerca de 90% (Adams et al., 1998).

Posteriormente, Adams e cols. em 2004, realizaram um estudo de acompanhamento, o STOP II, onde, crianças as quais as velocidades do DTC se normalizaram após receberem transfusões por pelo menos 30 meses, foram randomizadas para continuar as transfusões ou interromper a terapia. As velocidades do DTC do grupo de pacientes que interromperam as transfusões voltaram a se elevar. O estudo foi encerrado antes do previsto porque o grupo que descontinuou a terapia de transfusão apresentou um aumento considerável no acometimento pelo AVC, além também de apresentarem um DTC anormal (Adams et al. 2004).

Após vários estudos, Adams e col., definiram que crianças com AF que possuíam um DTC de alto risco possuíam um risco de desenvolver AVC cerca de 40 vezes maior, em contrapartida, pacientes na faixa condicionante também possuíam um risco considerável e mesmo os pacientes da faixa normal ainda possuíam cerca de 19% chance de desenvolvimento da complicação (Adams et Al., 2004, 1997, 1998). Além disso, o DTC se estabeleceu como uma ferramenta importante de detecção para os pacientes assintomáticos (Hirtz; Kirkham, 2019).

Os estudos realizados por Adams e col. continuam sendo, até hoje, um importante marco na forma como a prevenção do AVC em pacientes pediátricos com AF é conduzida (Crow, 2020). Atualmente, segundo a Sociedade Brasileira de Hematologia, o protocolo aplicado utiliza não apenas do regime de hipertransfusão mas também do uso da hidroxiúreia (HU) como forma de prevenção primária do AVC em pacientes pediátricos com AF. Dessa forma, fica-se sugerido que crianças com DTC normal devem repetir o exame anualmente; crianças com DTC condicionante devem repetir o exame semestralmente e a HU administrada numa dose de 20mg/kg/dia e crianças com DTC de alto risco devem repetir o exame trimestralmente e iniciar o protocolo e de transfusão sanguínea a cada 3-4 semanas com o intuito (assim como estabelecido no estudo STOP) de diminuir a concentração de HbS para menos que 30% e manter os níveis basais de hemoglobina maiores que 9 ug/dl. Os pacientes podem migrar para o tratamento com HU após 1 ano em regime transfusional salvo os casos onde o regime precisa ser mantido por mais tempo ou onde o paciente, por algum motivo decide interromper o regime de transfusão, ele pode ser substituído pelo uso exclusivo de HU, respeitando as doses diárias máximas permitidas (Debaun et al., 2020) (Figura 5).



**Figura 5:** algoritmo de estratificação do DTC em pacientes pediátricos com AF. (Mack & Thompson, 2017.)

### 2.2.2 Terapia de Transfusão Crônica e Hidroxiureia

A transfusão é utilizada em pacientes com AF de forma pontual para reverter situações como um quadro de anemia severa ou complicações de caráter agudo como sequestro esplênico, crises aplásicas e síndrome torácica aguda (STA). Já quando aplicada de forma crônica, a terapia de transfusão sanguínea atua na prevenção primária do AVC, na prevenção da recorrência de um novo AVC e nas crises vasculares (CVO) (Darshana; Rees; Premawardhena, 2021). A transfusão sanguínea em um paciente com AF atua de forma que a quantidade circulante de hemácias falcizadas contendo HbS são diluídas pela presença de hemácias contendo HbA, prevenindo episódios agudos de anemia e aumentando a oxigenação tecidual e diminuindo a ativação das células endoteliais. Aliado a isso, a velocidade dos vasos intracranianos é reduzida e associada a redução do grau de anemia do paciente atua como um dos possíveis mecanismos que podem estar relacionados a redução do risco de desenvolvimento do AVC (Estcourt et al., 2020).

Apesar dos benefícios já conhecidos, o regime de hipertransfusão pode causar consequências como deposição de ferro nos tecidos (principalmente fígado, coração e pâncreas), aloimunização eritrocitária e um aumento na susceptibilidade para transmissão de infecções transmissíveis pelo sangue (Seck et al., 2022). O depósito de ferro nos tecidos ocorre porque com o aumento de hemácias circulantes maior a hemólise e por consequência maior a quantidade de grupamento HEME livre, dessa forma, o manejo de pacientes sob regime de hipertransfusão na maioria das vezes é associado ao uso de um quelante de ferro (Graziadei et al., 2022; Soliman; Alaaraj; Yassin, 2021).

Já a aloimunização pode ocorrer pelas discrepâncias nos antígenos dos grupos sanguíneos entre doadores e receptores e a probabilidade da ocorrência em pacientes com AF em regime de hipertransfusão, sendo os anticorpos contra os antígenos Rhesus (RhD, RhC e RhE) e Kell (K) são os mais frequentes associados a esse fenômeno. Diversos fatores foram indicados como responsáveis pelas elevadas taxas de aloimunização, incluindo transfusões frequentes, disparidade de grupo sanguíneo entre doadores e receptores, inflamação crônica e herança de elemento imunoregulatórios (Brandow; Liem, 2022; Estcourt et al., 2020; Han; Hensch; Tubman, 2021). Algumas pesquisas já sugerem o uso da transfusão por troca de eritrócitos (Red Blood Exchange) como alternativa a transfusão sanguínea comum para evitar a aloimunização, uma vez que o procedimento consiste na retirada das hemácias do paciente e reposição com hemácias contendo HbA. Contudo o método não é aplicado em larga escala principalmente pela limitação técnica (Linder; Chou, 2021; Pirenne; Floch; Habibi, 2021; Seck et al., 2022).

A hidroxiuréia (HU), ou hidroxycarbamida, é um agente citostático específico da fase S do ciclo celular utilizado em doenças onco-hematológicas, e seu uso em pacientes com AF foi aprovado no Brasil há 15 anos (Brasil, 2002). Apesar de atualmente já existirem pesquisas que propõe o uso de outros medicamentos, o uso da HU continua sendo a alternativa de primeira escolha por ser um agente modificante direto da doença, diferente da terapia de transfusão (Dong; Mcgann, 2021). 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, 2013).

A HU se classifica como um agente modificador da AF pelo seu mecanismo de ação que consiste na indução da síntese de hemoglobina fetal (HbF) que é um potente agente inibidor da polimerização da HbS. Ainda não se sabe qual mecanismo ao certo que leva a indução da síntese de HbF mas discute-se que pode ocorrer dado a ação da HU nos progenitores eritróides na medula óssea, causando um estresse eritropoese como um todo, além disso vem sendo demonstrado na literatura que a HU tem efeitos sob os moduladores genéticos da expressão de HbF como *BCL11A*, *KLF-1* e *MYB*. Juntamente a indução da síntese de HbF, a HU também atua diminuindo a hemólise, por consequência diminui também a inflamação e induz o aumento da produção de óxido nítrico (Dong; Mcgann, 2021). De modo geral, a HU reduz a frequência de crises vaso-oclusivas, a necessidade transfusional e as hospitalizações dos pacientes, além de diminuir a taxa de mortalidade em aproximadamente 40%, quando utilizada por pelo menos um ano (Ataga; Rai, 2020; Darshana; Rees; Premawardhena, 2021).

Ware e cols. em 2012, desenvolveram o estudo SWITCH (do inglês, Stroke With Transfusions Changing to Hydroxyurea, SWITCH), onde o regime hipertransfusional foi substituído pelo uso da HU em pacientes com AF que haviam manifestado AVC previamente e que já tinham passado por, no mínimo, 18 meses de tratamento. Os dados mostraram que 10% dos pacientes tiveram recorrência de AVC (10 casos/100 pacientes/ano) frente a nenhum caso de recorrência nos pacientes com tratamento transfusional padrão, em contrapartida, a eficácia do uso da HU para a prevenção de um novo AVC, devido ao término precoce do estudo, foi inconclusiva. (Ware et al. 2012).

Posteriormente, em 2016, também Ware e col., realizaram o estudo TWITCH (do inglês, TCD With Transfusions Change to Hydroxyurea, TWITCH) onde foi demonstrado que, para crianças com alto risco no DTC que foram transfundidas há pelo menos um ano e sem evidência de vasculopatia cerebral demonstrada pela RMN, a hidroxiuréia pode substituir de forma eficaz a terapia de transfusão crônica (Ware et al., 2016). Anteriormente, em 2015, outro estudo demonstrou que o uso da HU reduzia a VMMF em crianças com AF e DTC na faixa condicional, sendo a HU uma opção de tratamento a ser considerada para crianças nessa faixa de risco (Hankins et al., 2015). Em 2011, Wang e col., executaram o estudo BABY HUG (Pediatric Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia, BABY HUG trial) multicêntrico randomizado de fase III, o qual foi

realizado com 213 lactentes com idade entre 9 e 18 meses com o objetivo de testar a eficácia e segurança do uso da HU em lactentes e crianças ainda muito novas onde resultados positivos foram obtidos (Wang et al., 2011).

Todos esses estudos foram importantes para o estabelecimento e protocolo do uso da HU em pacientes com AF, em especial para a prevenção de complicações cerebrovasculares como AVCI. Apesar dos efeitos adversos temporários, como leucopenia e plaquetopenia, que poderiam predispor os pacientes a infecções e sangramentos, o risco do uso da HU em pacientes é aceitável quando comparado com o risco de pacientes com AF não tratados. Entretanto, quando fala-se em tratamento com potencial curativo, a única alternativa existente atualmente é o transplante de medula óssea, aqui leva-se em consideração também que os pacientes pediátricos com histórico de acometimento por complicações cerebrovasculares quando submetidos ao transplante não apresentam recorrência de AVC (Ataga; Rai, 2020; Chianumba et al., 2022; Hasson et Al., 2019).

### **2.3 Modulares Genéticos**

Apesar de ser uma doença monogênica, pacientes com AF apresentam diversos fenótipos, onde as manifestações clínicas e intensidade delas são moduladas. Estudos retrospectivos trouxeram a proposta de que a modulação clínica da AF poderia ser feita por outros genes que estariam envolvidos em mecanismos diversos (Ballas, 2018). Alguns moduladores já são bem discutidos na literatura como a coexistência com alfa talassemia ( $\alpha$ -talassemia), a qual tem sido associada com uma menor taxa hemolítica, diminuição da contagem de reticulócitos e níveis mais baixos de LDH (Olatunya et al., 2019). Junto a isso, ocorre também a redução da HbS e por consequência a diminuição da polimerização, amenizando assim os eventos vaso-oclusivos, que acabam por exercer um efeito protetor contra complicações clínicas como o AVC (Steinberg; States, 2021). Outros moduladores bem estabelecidos são os haplótipos da globina  $\beta$ S, que são padrões de sítios polimórficos ligados ao cluster da  $\beta$ -globina e que influenciam na concentração da HbF a qual está relacionada com a evolução clínica de pacientes com AF por atuar justamente na diminuição da polimerização da HbS. Indivíduos com AF e haplótipo Senegal (SEN) ou Árabe-Indiano (ARB) apresentam maiores níveis de HbF, tendendo a apresentar

uma forma clínica menos grave da doença; por outro lado pacientes que apresentam haplótipo Bantu/República Central Africana (CAR) tendem a desenvolver um quadro clínico mais grave, pois cursam com níveis diminuídos de HbF. Por fim, pacientes que possuem o haplótipo Benin (BEN) apresentam quadros clínicos intermediários (Bernaudin et al., 2018).

Quando se trata especificamente do AVC, fala-se de uma complicação que se manifesta de forma bastante heterogênea e a fisiopatologia exata do AVCI na AF ainda é discutida até atualmente. O DTC possui algumas limitações técnicas de execução, somado ao fato de que a literatura trouxe ao longo dos anos que pacientes com DTC normal ainda chegavam a desenvolver AVC, foram levantadas hipóteses que genes envolvidos na regulação das vias de inflamação, metabolismo do óxido nítrico, vasorregulação, adesão celular e hemostasia eram os mais prováveis a estarem envolvidos nessa modulação. Flanagan e col. realizaram um estudo em 2011 e outro em 2013 com o intuito de validar os genes e polimorfismos que já haviam sendo citados como potenciais modulares em uma coorte de larga escala como ferramenta de melhoramento da acurácia da previsão de desenvolvimento ou não de AVC pelos pacientes com AF (Babalola et al. 2021; Fasola et el. 2022; Flanagan et al. 2011, 2013; J.M. et al. 2010).

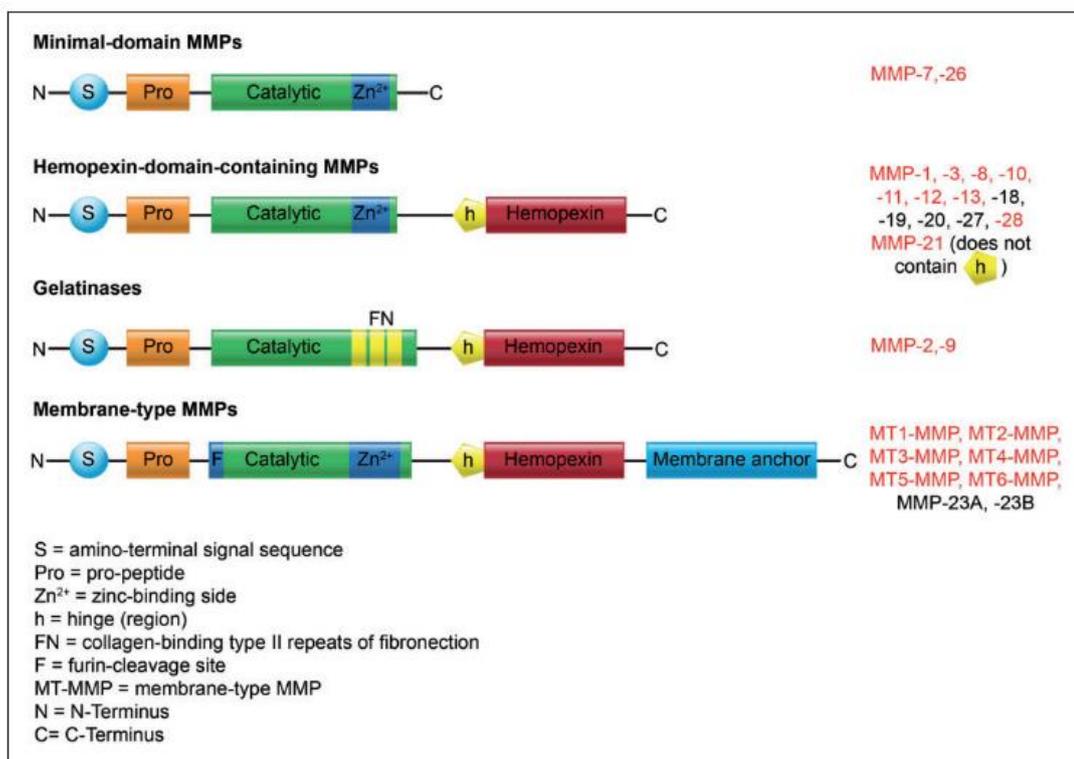
#### **2.4 A Fisiologia das Metaloproteinases de Matriz**

As metaloproteinases de matriz (MMP) são uma família de enzimas proteolíticas com diferentes substratos e diferentes localizações, mas todas são zinco dependentes e possuem a capacidade de degradar quase todos os elementos que compõem a matriz extracelular (MEC). Essa função proteolítica que as MMP's exercem sobre a MEC é essencial para diversos processos fisiológicos como embriogênese, angiogênese, cicatrização, remodelação e reparo tecidual, além de contribuírem, também, para a proliferação e diferenciação celular (Cerofolini; Fragai; Luchinat, 2018).

As MMP's podem ser classificadas pela sua estrutura em oito grupos ou pela atividade proteolítica exercida em cinco grupos, sendo essa última classificação a mais utilizada e melhor estabelecida. Quanto a atividade proteolítica, existem as collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelisinases (MMP-3 e MMP-10), matrilisinas (MMP-7 e MMP-26) e o grupo de MMP

do tipo membrana (MT-MMP-14, MT-MMP-15, MT-MMP-16, MT-MMP-17, MT-MMP-24 e MT-MMP-25) (Cabral-Pacheco et al., 2020).

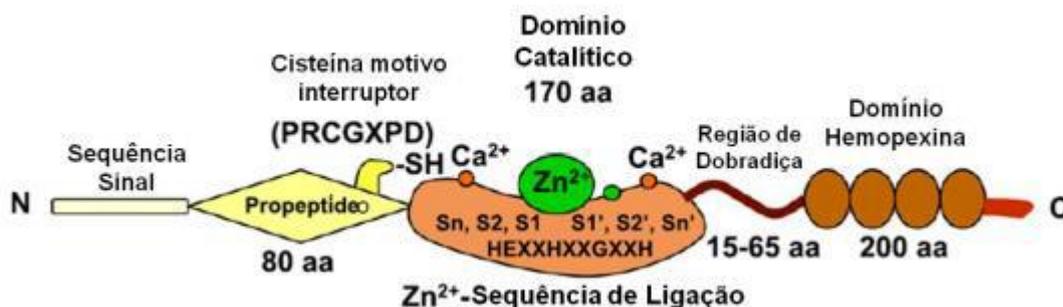
Estruturalmente falando, as MMP's são um tipo de proteína multidomínio cuja composição se dá por uma sequência de um pro-peptídeo (pro-domínio), um domínio catalítico, uma região de dobradiça ligante de peptídeo e um domínio de hemopexina. Essa estrutura é comum a todas as MMP's com exceção das MMP7 e MMP26 que não possuem o domínio de hemopexina, das MT-MMP's que possuem uma âncora de membrana e das gelatinases (MMP2 e MMP9) possuem um domínio de repetição de fibronectina (FN) que é responsável pela ligação com o colágeno do tipo II que elas irão degradar (Figura 6) (Rempe; Hartz; Bauer, 2016) .



**Figura 6:** Diferentes estruturas das metaloproteinases de matriz. As MMP's são divididas em grupos estruturais distintos. As MMP's de domínio mínimo que possuem uma sequência amino terminal (S), um pro-peptídeo que mantém a metaloproteinase em forma de zimogênio inativo e um domínio catalítico que contém um sítio de ligação rico em Zinco. As MMP's com domínio de hemopexina possuem adicionalmente a essa estrutura um domínio de hemopexina. As Gelatinases possuem uma região com repetições de fibronectina (FN). E as MMP's do tipo membrana tem um domínio de ancoragem (Rempe; Hartz; Bauer, 2016).

No pro-domínio há uma região chamada de interruptor motivo de cisteína, que interage com o domínio catalítico de zinco ( $Zn^{2+}$ ) de forma que a ligação com o substrato para ativação da proteína é impedida e a MMP se mantém na forma não ativa (pro-MMP). O domínio catalítico é composto por dois íons de zinco, três de cálcio

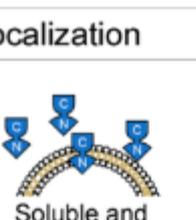
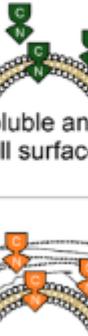
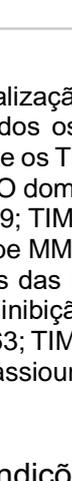
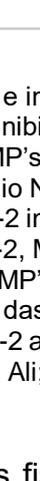
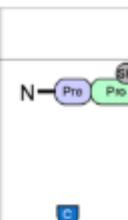
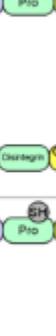
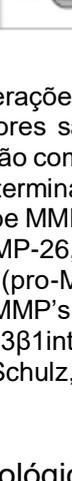
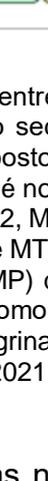
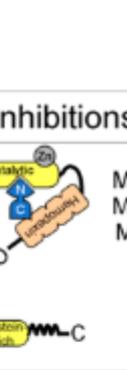
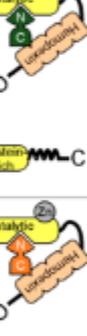
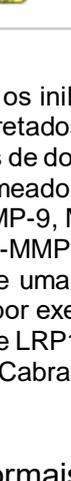
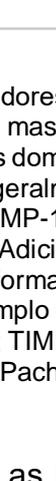
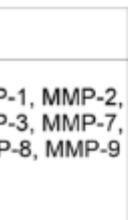
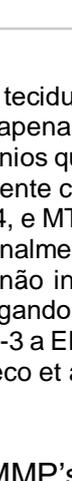
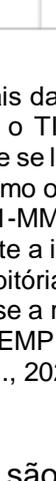
(Ca<sup>2+</sup>) e três resíduos de histidina que são altamente conservados. Na porção final e um pouco mais externa do domínio catalítico há uma região chamada de bolsão S1', esse bolsão é a região mais variável das MMP's, e é um fator determinante para a especificidade da ligação com os seus respectivos substratos, no entanto existem seis tipos de bolsões (P1, P2, P3, P1', P2' e P3') e os substratos ou inibidores das MMPs podem ser nomeados de acordo com a interação com esses bolsões (R1, R2, R3, R1' ou Ra, R2' e R3'). A região de dobradiça permite a flexibilidade de interação entre os domínios e confere estabilidade a enzima, já o domínio de hemopexina é importante para garantir a especificidade dos substratos (Figura 7) (Bassiouni; Ali; Schulz, 2021; Laronha et al., 2020).



**Figura 7:** representação da estrutura molecular geral das metaloproteínas. (Maccoll; Khalil, 2015.)

A maioria das MMP's são secretadas no meio extracelular com exceção principalmente das MMP's que possuem domínio transmembrana (MT-MMP) que ficam ancoradas na membrana celular. Para a ativação das MMP's, é necessário que a remoção da ligação do motivo de cisteína do sítio catalítico de Zn<sup>2+</sup> e a regulação da atividade dessas metaloproteínas é feita principalmente pelos inibidores teciduais de metaloproteínas (TIMP - *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*). As TIMP's são um grupo de quatro proteínas endógenas (TIMP 1,2,3,4) que possuem um domínio C-terminal e um N-terminal com 125 e 65 aminoácidos respectivamente. O domínio N-terminal possui dois grupos de quatro resíduos Cys-Thr-Cys-Val e Glu-Ser-Val-Cys e ele é responsável pela inativação das MMP's através da sua ligação com o domínio catalítico. Já o domínio C-terminal liga-se ao domínio de hemopexina o que confere maior estabilidade a reação (Figura 8) (Bassiouni; Ali; Schulz, 2021; Cabral-Pacheco et al., 2020; Laronha et al., 2020). A regulação das MMP's pode ainda ser feita por inibidores endógenos não específicos como a  $\alpha$ -macroglobulina que é

encontrada no sangue fluidos teciduais e atua se ligando a MMP formando um complexo que posteriormente é endocitado e degradado no interior da célula. Já trombospondina-2 atua através do mesmo mecanismo, mas apenas inibindo a MMP2 e MMP9 (Das; Amin; Jha, 2021; Polonikov et al., 2019).

	Localization	Inhibitions	Bindings
TIMP-1	 Soluble and cell surface	 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9  ADAM-10	 ProMMP-9  CD63, LRP1
TIMP-2	 Soluble and cell surface	 MMP-2, MMP-9, MMP-14, MT1-MMP  ADAM-12	 ProMMP-2  $\alpha 3 \beta 1$ integrin, LRP1
TIMP-3	 Extracellular matrix and cell surface	 MMP-2, MMP-9  ADAM-17, ADAM-10, ADAMTS4	 ProMMP-2, ProMMP-9  EFEMP1, VEGFR2, AGTR1, 2
TIMP-4	 Soluble and cell surface	 MMP-2, MMP-26, MT1-MMP  ADAM-28	 ProMMP-2  CD63

**Figura 8:** Localização e interações entre os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP's) e as MMP's. Todos os inibidores são secretados mas apenas o TIMP-3 é incorporado na matriz. Estruturalmente os TIMP's são compostos de dois domínios que se localizam lado a lado (N-terminal e C-terminal). O domínio N-terminal é nomeado geralmente como o domínio. O TIMP-1 inibe MMP-1-3 e MMP-7-9; TIMP-2 inibe MMP-2, MMP-9, MMP-14, e MT1-MMP; TIMP-3 inibe MMP-2 e MMP-9 e TIMP-4 inibe MMP-2, MMP-26, e MT1-MMP. Adicionalmente a isso, os TIMP's interagem com as formas inativas das MMP's (pro-MMP) de uma forma não inibitória, ou seja, eles exercem outras funções fora a inibição das MMP's como por exemplo ligando-se a receptores de membrana celular (TIMP-1 a CD63; TIMP-2 a  $\alpha 3 \beta 1$  integrina e LRP1; TIMP-3 a EFEMP1, VEGFR2 e AGTR1,2; e TIMP-4 to CD63) (Bassiouni; Ali; Schulz, 2021; Cabral-Pacheco et al., 2020).

Em condições fisiológicas normais as MMP's são expressas nos tecidos em quantidades mínimas basais e apenas são aumentadas quando necessário. Quando produzidas, elas então são liberadas no meio extracelular nas suas formas latentes/

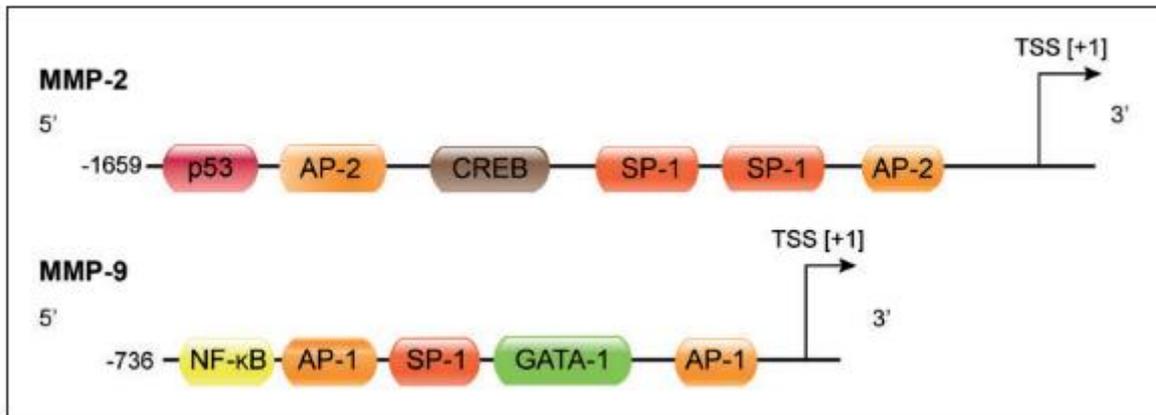
inativas chamadas de pro-MMP's (zimogênio) e então a ativação é feita através da proteólise da porção N-terminal no meio extracelular por outras MMP's ou por outras proteases, já no meio intracelular a ativação pode ocorrer através de outras reações como a fosforilação. Esses mecanismos, juntamente com a inibição mediada pelos TIMP's, conferem um equilíbrio homeostático as atividades das MMP's, quando esse equilíbrio é afetado por alguma condição a ativação das MMP's pode ocorrer por outros fatores como por exemplo espécies reativas de oxigênio, hipóxia tecidual, alterações no pH e NO. Esse desequilíbrio pode estar associado a diversas patologias como processos inflamatórios, artrite, câncer e metástase, doenças neurodegenerativas, diabetes, cirrose hepática, doenças pulmonares fibróticas e aterosclerose (Cerofolini; Fragai; Luchinat, 2018; Laronha et al., 2020; Rempe; Hartz; Bauer, 2016).

#### **2.4.1 As metaloproteinases de matriz 2 e 9: atividade e expressão**

As gelatinases possuem substratos em comum como vários tipos de colágeno, fibronectina, elastina IL-1B e TGF-B. De forma geral, elas estão associadas principalmente a degradação da MEC, como também chegam a estar envolvidas no remodelamento do tecido conjuntivo, no entanto, a elevada afinidade que elas possuem pelo colágeno do tipo IV, um elemento importante da membrana basal, torna as gelatinases capazes de atravessar o endotélio durante processos inflamatórios. A regulação da atividade das gelatinases ocorre da mesma forma que as outras MMP's, a nível transcricional, e pela ativação e inibição da enzima por fatores endógenos (Kurzepa et al., 2014).

O gene *MMP2*, localiza-se no cromossomo 16 (16q12.2), e o *MMP9*, está localizado no cromossomo 20 (20q11.1-13.1), a regulação dos níveis de expressão das gelatinases é feita principalmente através de moléculas inflamatórias. No caso da *MMP9*, moléculas como o fator de necrose tumoral (TNF-a), IL17 e espécies reativas de oxigênio estimulam a transcrição através do fator de transcrição ativador da proteína 1 (AP-1) e do NF-KB e esse estímulo pode ser inibido pelo interferon-g. Em contrapartida, moléculas como IL-4, IL-10 e interferon-B, atuam inibindo a expressão de *MMP9*. Já a *MMP2*, por outro lado, é regulada pelo TNF-a e pela ação da p38-MAPK (que atua através do NFkB). De forma sintetizada, a regulação da expressão de ambas as metaloproteinases 2 e 9 é feita através de um equilíbrio complexo entre

moléculas pró e anti-inflamatórias, mas estruturalmente falando a região promotora e os sítios de ligação dos fatores de transcrição são diferentes (Figura 9) (Cabral-Pacheco et al., 2020; Gao et al., 2019; Kurzepa et al., 2014; Rempe; Hartz; Bauer, 2016)



**Figura 9:** Região promotora de MMP-2 e MMP-9 com os sítios de ligação de seus fatores de transcrição. As caixas representam os sítios específicos de cada fator de transcrição. TSS: sítio de início de transcrição; AP-1 e AP-2 (proteínas ativadoras 1 e 2); GATA-1; fator de transcrições eritroide, fator de transcrição de globina 1; SP-1 (proteína de especificidade 1); NF-κB; CREB (cyclic AMP response-element binding protein); p53 (proteína tumoral) p53 (Rempe; Hartz; Bauer, 2016).

A expressão de MMP9 é encontrada principalmente em leucócitos, células da micróglia, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, podendo ser expressa também em células neoplásicas. Já a MMP2 é mais expressa em células da micróglia, adipócitos, células endoteliais e musculares (Kurzepa et al., 2014).

#### 2.4.2 As metaloproteinases de matriz 2 e 9: polimorfismos e complicações neurológicas

O polimorfismo rs243865 é localizado na região promotora do gene *MMP2* e consiste na mutação C>T na posição -1306. Essa alteração leva a um bloqueio da ligação com proteína estimulante 1 (Sp1), que é um fator de transcrição, dessa forma, a presença do alelo T foi associado com menores níveis de expressão da MMP2 (Dofara; Chang; Diorio, 2020). Esse polimorfismo já foi associado com o desenvolvimento de AVC do tipo aterosclerótico, aneurisma cerebral, câncer de mama e desenvolvimento de esclerose lateral amiotrófica (ELA) (Alg et al., 2018; Beladi Moghadam et al., 2021; Kurzepa et al., 2014; Sánchez-Torres et al., 2020).

Já o polimorfismo rs17576 está localizado no éxon 6 do gene *MMP9* e consiste na mutação A>G (R279Q), que leva a substituição de uma glutamina por uma arginina. Essa mudança altera diretamente a conformação do domínio catalítico da *MMP9*, o que afeta na ligação dos substratos e por consequência suas atividades enzimáticas (Feng et al., 2021; Mahmood et al., 2018). E esse polimorfismo sendo relacionado na literatura com diversas doenças como câncer de mama, síndrome do ovário policístico, diabetes tipo 2, como também complicações cerebrovasculares e neurológicas como AVC, aneurisma e estenose cerebral (Du et al., 2022; Elgebaly; Arreguin; Storke, 2019; Fan et al., 2022; Hao et al., 2015; Nie; Wang; Tang, 2014).

Durante o processo do AVC, a *MMP9* é mais expressa e a *MMP2* tem a sua expressão relativamente diminuída, da mesma forma que em fases tardias, após o AVC, ambas as gelatinases aparentam estar envolvidas com o processo de recuperação tecidual após a obstrução e interferência sofrida pela barreira hematoencefálica durante o AVC (Montaner et al., 2019; Polonikov et al., 2019).

Diante disso, devido ao evidente papel das metaloproteinases de matriz 2 e 9 nos processos de injurias cerebrais e dos relatos da associação de seus respectivos polimorfismos com diferentes tipos de AVC. Não apenas isso, elas também estão intimamente relacionadas com processos inflamatórios, mecanismo importante para a fisiopatologia da AF, nós levantamos a hipótese de que esses polimorfismos de impacto funcional (rs243868 e rs17576) estarem associados em determinado grau com o desenvolvimento de complicações cerebrovasculares da AF.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo Geral

Investigar a associação dos polimorfismos rs243865 do gene *MMP2* e rs17576 *MMP9*, com complicações cerebrovasculares de pacientes pediátricos com anemia falciforme acompanhados pelo ambulatório do Programa de Triagem Neonatal da Fundação HEMOPE.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Determinar as frequências genótípicas e alélicas e de ambos os polimorfismos (rs243865, rs17576) dentro da coorte de pacientes pediátricos com anemia falciforme acompanhados pelo ambulatório do Programa de Triagem Neonatal da Fundação HEMOPE ;
- Verificar a existência da associação entre as frequências alélicas e genótípicas de ambos os polimorfismos (rs243865, rs17576) com as complicações cerebrovasculares dos pacientes pediátricos com anemia falciforme acompanhados pelo ambulatório do Programa de Triagem Neonatal da Fundação HEMOPE ;
- Verificar a existência da associação entre as frequências alélicas e genótípicas de ambos os polimorfismos (rs243865, rs17576) com as variáveis laboratoriais de maior importância dentro do contexto da anemia falciforme dos pacientes acompanhados pelo ambulatório do Programa de Triagem Neonatal da Fundação HEMOPE

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1 Desenho do estudo**

Este trabalho trata-se de um estudo do tipo coorte retrospectivo com comparação interna de grupos. O projeto está sendo desenvolvido no Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (LABCEN-UFPE) onde foram realizados os testes moleculares, tendo a Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) como instituição coparticipante, onde estão sendo coletadas as amostras e realizadas as análises dos prontuários dos pacientes participantes.

### **4.2 Definição dos grupos**

A amostra incluída no estudo é constituída por indivíduos com anemia falciforme entre 02 e 20 anos de idade (até a data da censura do estudo 01/01/2022), não aparentados, de ambos os sexos, acompanhados pelo ambulatório do Programa de Triagem Neonatal da Fundação HEMOPE. A faixa etária e classificação dos pacientes enquanto pediátricos foi realizada a partir dos critérios de definição estabelecidos pela OMS que inclui no grupo pediátrico pacientes de 02 a 19 anos e 11 meses, aproximadamente. Sendo assim os pacientes nessa faixa etária na fundação HEMOPE são acompanhados por uma pediatra até por volta dos seus respectivos 20 anos de idade;

Dessa forma, após análise dos prontuários de 400 pacientes pediátricos com AF, 36 foram excluídos do estudo por apresentarem acompanhamento ambulatorial irregular e/ou perda de seguimento, de modo que 364 indivíduos foram selecionados. Durante a análise dos prontuários, os pacientes foram estratificados de acordo com seu curso clínico, bem como coletados os seus dados laboratoriais, sendo realizada a divisão dos grupos conformes os critérios que se seguem :

I. O acidente vascular cerebral (AVC) foi definido como uma perda local do fluxo sanguíneo cerebral devido à estenose ou oclusão das artérias cerebrais, confirmado posteriormente por exames de imagem. Constituindo um grupo de 24 indivíduos;

II. Grupo Doppler Transcraniano: composto por indivíduos que apresentaram registro de realização de Doppler Transcraniano (DTC) (n=349). De acordo com a velocidade máxima obtida no DTC, os pacientes foram estratificados

como se segue: DTC normal (velocidade de fluxo < 170 cm / s), DTC condicional (velocidade de fluxo entre 170-199 cm / s), e DTC alto risco (velocidade de fluxo  $\geq$  200 cm / s). Paras as análises neste grupo, pacientes com DTC inadequado (isto é, velocidade de fluxo não detectada pelo exame devido à limitação técnica), e inconclusivo (isto é, resultados de DTC que não puderam ser interpretados), foram excluídos (Adams et al. 1998).

II. Grupo doença cerebrovascular (DCV): composto por indivíduos que apresentam registro de ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada mostrando lesão neurológica consequente de acidente vascular cerebral (AVC) e por indivíduos dentro da faixa de alto risco determinada pela velocidade do DTC ( $\geq$ 200 cm/s). (n=51)

III. Grupo outras complicações cerebrovasculares: composto por indivíduos que foram acometidos por complicações cerebrovasculares que não o AVC por se manifestarem em uma frequência menor dentro da coorte, sendo elas: ataque isquêmico transitório (AIT), infarto silencioso (IS) e síndrome Moya-Moya; (n=22)

Quanto aos dados laboratoriais, foram coletadas as informações de maior relevância dentro do contexto da anemia falciforme tais como: RBC (Número de células Vermelhas, do inglês *Red Blood Cells*), Hemoglobina (Hb), Hematócrito (Ht); Volume corpuscular médio (VCM); Hemoglobina corpuscular média (HCM); WBC (Número de células brancas, do inglês *White Blood Cells*), Contagem de plaquetas (PLT), HbF, Contagem de reticulócitos (RET), Lactato desidrogenase (HDL), Bilirrubina total (BT), Bilirrubina indireta (BI), Bilirrubina direta (BD).

### **4.3 Aspectos Éticos**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CEP/CCS/UFPE), assim como pelo comitê de ética do HEMOPE (Numero do parecer: 4.856.530) (Anexo I). Os participantes e os responsáveis daqueles menores de 18 anos foram orientados sobre a proposta da pesquisa e quando em concordância, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pelo CEP (Anexo II).

#### 4.4 Coleta de material e dados clínicos

De todos os indivíduos que se dispuseram a participar da pesquisa, após assinatura do TCLE, foram realizadas coletas de amostras de sangue periférico para realização das análises moleculares. Foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) para realização dos experimentos. Para os pacientes incluídos no estudo de expressão gênica mais um tubo de 5ml em EDTA foi coletado. As amostras coletadas foram conduzidas ao laboratório de Hematologia e Biologia Molecular do LABCEN-UFPE, onde foram processadas para que as análises moleculares pudessem ser realizadas.

Os dados clínicos (ocorrência das manifestações clínicas) e laboratoriais (hematológicos, bioquímicos e quantificação das hemoglobinas) foram obtidos pela análise dos prontuários médicos dos pacientes que comparecem regularmente ao ambulatório de Hematologia da Fundação HEMOPE.

#### 4.5. Análise molecular

##### 4.5.1 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos pela técnica de fenol-clorofórmio modificada, estabelecida por Davis et. al., (1986). O DNA obtido foi então solubilizado em água deionizada e estéril e quantificado utilizando o equipamento NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) e a análise qualitativa realizada em gel de agarose 1,0%.

##### 4.5.2 Genotipagem dos polimorfismos dos genes *MMP2* e *MMP9*

Foram selecionados para este estudo dois SNPs localizados no gene *MMP2* e *MMP9* que apresentavam impacto funcional estabelecido na literatura: *MMP2* rs243865 (-1306 C>T) e do *MMP9* rs17576 (A>G). Além disso, outro critério de seleção foi que os SNPs apresentassem MAF (do inglês, minor allele frequency) igual ou superior a 10% na população africana (YRI) e caucasiana (CEU).

A metodologia empregada para a realização das genotipagens foi PCR em tempo real por discriminação alélica utilizando o sistema de sondas TaqMan®, que consiste em sondas marcadas com fluorocromos desenhadas especificamente para serem complementares à cadeia de oligonucleotídeos de interesse. As sondas utilizadas no estudo foram VIC (yellow) e FAM (green) e os primers utilizados para

pesquisa dos polimorfismos estão disponíveis para o uso em pesquisa de caráter científico no site (<https://products.appliedbiosystems.com> – ID: C\_\_\_3225943\_10 e C\_\_11655953\_10). Para realização desta técnica foi utilizado o aparelho QuantStudio™ 5, (Applied Biosystems) disponibilizado para uso no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (FIOCRUZ/UFPE).

As reações foram preparadas em um volume final de 10 µL, utilizando 5 µL de Taqman Genotyping Master Mix (Thermofisher, Foster City, EUA), 0,25 µL de sonda Taqman na concentração de 20 vezes (Thermofisher, Foster City, EUA), 3,75 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura e 1 µL de DNA na concentração de 50 ng/µL. A ciclagem para os ensaios foi 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a reação de PCR, foi definido o threshold para análise, plotando-se os sinais de fluorescência para cada amostra e assim discriminando os alelos presentes, conforme recomendações do fabricante (Life Technologies, Califórnia, USA).

**Quadro 1.** Protocolo padrão de condição de reação da TaqMan® para amplificação por qPCR.

HOLD		QUANTIDADE DE CICLOS			
		40 ciclos			
HOLD		DESNATURAÇÃO		HIBRIDIZAÇÃO/EXTENSÃO	
Tempo	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo	Temperatura
10 min	95°	15 seg	95° C	1 min	60°

#### 4.6 Análise estatística

As características clínico-laboratoriais dos indivíduos foram apresentadas de forma descritiva. O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado usando o teste de Chi-quadrado. Para comparações entre variáveis categóricas, o teste Chi-quadrado ou teste exato de Fisher's (quando aplicável) foi utilizado, 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 manifestações foi avaliado a partir da análise das datas de desenvolvimento das complicações, em relação à data de nascimento. Todos os valores de P foram ajustados para os dois lados com nível de significância a 0,05. As análises foram realizadas utilizando os softwares SPSS Statistics 19.0 (IBM corporation) e GraphPad Prism (version 6.0) (GraphPad Software, San Diego, CA,

## 5. Resultados

### 5.1 Caracterização da coorte

Foram incluídos no estudo 364 indivíduos com acompanhamento regular no HEMOPE, sendo 178 do sexo feminino e 186 do sexo masculino. A mediana de idade destes indivíduos foi de 14 anos (variação: 02 – 20 anos). Os dados da caracterização laboratorial da população geral constam na Tabela 1.

**Tabela 1:** Caracterização laboratorial dos pacientes incluídos no estudo

<b>Variável laboratorial</b>	<b>Mediana</b>	<b>Intervalo</b>
HbF (%)	9,2	0,8 – 23,4
Contagem de hemácias (x10 <sup>12</sup> células/ul)	3,13	1,6 – 3,8
Hemoglobina (g/dL)	7,6	4,8 - 11,6
Hematócrito (%)	22,6	14,7 – 33,2
Volume corpuscular médio (fL)	86,9	69,0 – 103,4
Hemoglobina corpuscular média (g/dL)	29,3	17,3 – 35,7
Contagem de leucócitos (10x <sup>6</sup> /L)	14,5	2,8 – 48,9
Contagem de plaquetas (10x <sup>9</sup> /L)	454,0	114,0 – 1.010,0
Contagem de reticulócitos (%)	10,0	0,4 – 29,2
Lactato desidrogenase (U/L)	826,5	124,0 – 2401,0
Bilirrubina total (mg/dL)	1,9	0,38 – 39
Bilurubina indireta (mg/dL)	1,5	0,24 – 11
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,4	0,05 – 2,5

Dos 364 pacientes, 24 (6,6%) apresentavam episódio de AVC, 35 (9,6%) se classificavam dentro do grupo doença cerebrovascular (DCV) estabelecendo uma relação AVC/DCV de 24/35 (68,6%). As taxas de ocorrência de AVC de acordo com os grupos do DTC foram de: 7/240 (2,9%) para os indivíduos com DTC normal, 4/75 (5,33%) para os indivíduos com DTC condicionante e no grupo de alto risco 13/34 (38,23%). Dezenove pacientes foram excluídos da análise estatística do DTC por apresentarem resultados inconclusivos, inadequados ou por nunca terem realizado o exame até a data de coleta de dados dos seus respectivos prontuários, 22 (6,2%) pacientes desenvolveram outras complicações cerebrovasculares sendo 5 deles

acometidos por infarto silencioso, 3 por ataques isquêmico transitório e 9 pela síndrome Moya -Moya. (Tabela 2)

**Tabela 2:** Caracterização clínica dos pacientes incluídos no estudo

<b>Características clínicas dos indivíduos incluídos no estudo</b>	<b>N(%) (n total = 364)</b>
<b>Sexo</b>	
Feminino	178
Masculino	186
<b>Idade</b>	
Intervalo (anos)	02 - 20
Mediana (anos)	14
<b>Acidente Vascular Encefálico</b>	24 (6,6%)
Intervalo de idade (anos)	02 - 12
Mediana de idade (anos)	06
<b>Doppler Transcraniano</b>	349
Normal	240 (68,8%)
Condicionante	75 (21,5%)
Alto risco	34 (9,7%)
<b>Faixa de Risco para desenvolvimento de AVC</b>	34 (9,3%)
Doença cerebrovascular	35 (9,6%)
<b>Outras complicações cerebrovasculares</b>	22 (6,2%)

## 5.2 Genotipagem dos SNPs do gene MMP2 e MMP9

A genotipagem dos SNPs dos genes MMP2 e MMP9 foram realizadas em 364 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 3.

**Tabela 3:** Frequências alélicas e genotípicas do SNP estudado na população

Gene SNP	Genótipos	Frequência Genotípica (n e %)	Alelos	Frequência Alélica (%)
<b>MMP2</b> <b>rs243865</b>	CC	243 (66,8%)	C	80,2%
	CT	98 (26,9%)		
	TT	23 (6,3%)	T	19,8%
<b>MMP9</b> <b>rs17576</b>	AA	176 (48,4%)	A	69,1%
	AG	151 (41,5%)	G	30,9%
	GG	37 (10,2%)		

### 5.3 Associação dos SNPs dos genes *MMP2* e *MMP9* com as complicações cerebrovasculares e variáveis laboratoriais dos pacientes

Para o estudo de associação, foram aplicados o modelo de herança genética dominante, recessivo, codominante e sobredominante do polimorfismo, mas o modelo de herança codominante foi escolhido para demonstração dos dados por ser mais representativo. Foi analisada a associação dos polimorfismos de forma independente com todas as variáveis laboratoriais dos pacientes, quanto ao polimorfismo rs243865 do gene *MMP2* nenhuma associação significativa foi encontrada tendo sido levado em conta o valor de  $p$  significativo ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4). Já com relação ao polimorfismo rs17576 do gene *MMP9* pelo modelo codominante (homozigoto selvagem AA versus heterozigoto AG versus homozigoto variante GG) foi encontrada uma associação com a variável laboratorial RBC ( $p = 0,032$ ); bilirrubina total (BT) ( $p = 0,003$ ) e com a bilirrubina indireta (BI) ( $p = 0,007$ ). Quando aplicado o modelo dominante (homozigoto selvagem AA, versus heterozigoto AG e homozigoto variante GG), foi encontrado para a BT  $p = 0,002$  e para BI  $p = 0,006$  (Tabela 5).

**Tabela 4:** Comparação dos achados clínico-laboratoriais dos pacientes com AF para o polimorfismo *rs243865* do gene *MMP2* de acordo com modelo de herança codominante.

Características clínicas e laboratoriais	Total: 364 N(%)	Homozigoto selvagem CC Total: 243 N(%)	Heterozigoto CT Total:98 N(%)	Homozigoto Variante TT Total: 23 N(%)	p-valor
Hb F (%) mediana	9,8	10,2	8,9	9,2	0,787
Intervalo	0,8 - 23,4	0,8 – 22,4	13,1 - 23,4	1,1 – 17,8	
RBC (X10 <sup>12</sup> /ul) mediana	3,13	2,7	2,64	2,68	0,590
Intervalo	1,6 - 3,8	1,96 – 3,95	2,05– 4,98	1,86 – 3,81	
Hb (g/dL) mediana	7,6	7,9	7,6	8,2	0,608
Intervalo	4,8 – 11,6	5,1 - 10,6	4,8 – 11,0	5,7 – 9,8	
Ht(%) mediana	22,6	24,4	23,2	25,7	0,224
Intervalo	15,7 – 33,2	17,5 – 31,1	14,7 – 33,2	18,4 – 30,0	
VCM (fL) mediana	86,9	85,3	88,2	87,4	0,836
Intervalo	69 – 103,4	62,6–98,3	53,4–103,4	72,4– 100,7	
HCM (g/dL) mediana	29,3	28,1	30,0	30,6	0,348
Intervalo	17,3 -33,7	19,8 – 32,9	19,2– 35,7	23,3 – 34,2	
WBC (x10 <sup>6</sup> /L) mediana	14,5	13,7	15,5	13,6	0,929
Intervalo	2,8 – 48,9	2,3 – 48,9	2,1 – 25,1	3,3 – 24,2	0,346
PLT (x10 <sup>9</sup> /L) mediana	454	450	461	448	
Intervalo	114 – 1010	114 – 981	131 – 875	155 – 678	0,942
Reticulócitos (%) mediana	10	9,0	10	11,1	
Intervalo	0,4 – 29,2	0,4 – 22,3	1,5-29,2	5,4 – 15,5	0,118
LDH (U/L) mediana	826,5	797	929	823	
Intervalo	120 - 2401	57 - 2219	2401	124 – 1778	
BT (mg/dL) mediana	1,9	2,3	2,45	2,2	0,221
Intervalo	0,38 – 8,92	0,38 – 8,92	0,52 – 8,92	0,85 – 6,55	0,408
BI (mg/dL) mediana	0,24 – 8,52	0,24 – 7,62	0,35 – 8,52	0,52 – 6,13	
Intervalo					
<b>Sexo</b>					
Feminino	148(48,9%)	130 (48%)	85 (48%)	36 (51,4)	0,957
Masculino	186(51,1%)	140 (52%)	92 (52%)	34 (48,6)	
<b>AVC</b>					
Sim	24 (6,6%)	21(8,6%)	3 (3,06%)	0 (0%)	0,073
Não	339(93,1%)	222(91,3%)	95(96,9%)	23 (100%)	
<b>DTC</b>					
Normal	240(68,8%)	119(67,6%)	96 (63,1%)	25 (69,4%)	0,478
Condicionante	75 (21,5%)	38 (21,6%)	28 (18,4%)	9 (25%)	
Alto risco	34 (9,7%)	14 (7,9%)	19 (12,5%)	1 (2,8%)	
<b>DCV</b>					
Sim	35 (9,6%)	27 (11,1%)	6 (6,1%)	2 (8,7%)	0,224
Não	230(63,2%)	148(60,9%)	69 (70,4%)	13 (56,5%)	
<b>Outras</b>					
Sim	22 (6,2%)	16 (6,6%)	6 (6,1%)	0(0,0%)	
Não	334(91,7%)	227(93,4%)	42 (42,8%)	23 (100%)	0,453

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, AVC: Acidente Vascular Cerebral; DCV: Doença Cerebrovascular; DTC: Doppler Transcraniano, Outras: Ataque isquêmico transitório, Infarto silencioso e Moya Moya

\*Diferença estatisticamente significativa (p < 0.05).

**Tabela 5:** Comparação dos achados clínico-laboratoriais dos pacientes com AF para o polimorfismo *rs17576* do gene *MMP9*, de acordo com modelo de herança codominante.

Características clínicas e laboratoriais	Total: 364 N(%)	Homozigoto selvagem AA Total: 176 N(%)	Heterozigoto AG Total:152 N(%)	Homozigoto Variante GG Total: 36 N(%)	p-valor
Hb F (%) mediana	9,8	10,2	9,7	10,6	0,578
Intervalo	0,8 - 23,4	0,8 - 23,4	1,6 - 21,7	3,3 - 16,9	
RBC (X10 <sup>12</sup> /ul) mediana	3,13	2,7	2,59	2,37	<b>0,032*</b>
Intervalo	1,6 - 3,8	2,09 - 4,98	2,05- 4,32	1,60 - 2,7	
Hb (g/dL) mediana	7,6	9,4	7,5	7,6	0,118
Intervalo	4,8 - 11,6	4,8 - 11,6	5,2 - 10,0	5,2 - 9,1	
Ht(%) mediana	22,6	23,1	23,2	21,7	0,419
Intervalo	15,7 - 33,2	14,7 - 33,2	18,1 - 29,5	15,7 - 26,3	
VCM (fL) mediana	86,9	87,2	87,4	85,8	0,711
Intervalo	69 - 103,4	53,4-103,4	61,1-100,7	79 - 96	
HCM (g/dL) mediana	29,3	29,05	29,3	28,8	0,240
Intervalo	17,3 -33,7	17,3 - 35,7	19,2- 32,8	24,7 - 31,4	
WBC (x10 <sup>6</sup> /L) mediana	14,5	14,2	14,1	14,6	0,538
Intervalo	2,8 - 48,9	2,8 - 48,9	2,1 - 30,8	2,1 - 2560	
PLT (x10 <sup>9</sup> /L) mediana	454	435	461	354	0,813
Intervalo	114 - 1010	114 - 1100	155 - 717	136 - 739	
Reticulócitos (%) mediana	10	10,4	10,7	10	0,742
Intervalo	0,4 - 29,2	0,8 - 22,3	1,5-26,4	5 - 15,4	
LDH (U/L) mediana	826,5	830	825	780	0,752
Intervalo	120 - 2401	120 - 2401	58 - 1778	124 - 1605	
BT (mg/dL) mediana	1,9	2,3	2,6	2,7	<b>0,003*</b>
Intervalo	0,38 - 8,92	0,98 - 8,7	0,5 - 8,92	0,51 - 8,10	
BI (mg/dL) mediana	1,5	1,67	1,64	1,48	<b>0,007*</b>
Intervalo	0,24 - 8,52	0,24 - 8,4	0,38 - 8,52	0,31 - 7,62	
<b>Sexo</b>					
Feminino	148(48,9%)	130 (48%)	85 (48%)	36 (51,4)	0,177
Masculino	186(51,1%)	140 (52%)	92 (52%)	34 (48,6)	
<b>AVC</b>					
Sim	24 (6,6%)	12(6,8%)	11 (7,2%)	1 (2,8%)	0,593
Não	339(93,1%)	164(93,2%)	141 (92,7%)	35 (97,2%)	
<b>DTC</b>					
Normal	240(68,8%)	162(66,7%)	61 (62,3%)	17 (73,9%)	0,258
Condicionante	75 (21,5%)	53 (21,8%)	18 (18,4%)	4 (17,4%)	
Alto risco	34 (9,7%)	20 (8,2%)	13 (13,3%)	1 (4,3%)	
<b>DCV</b>					
Sim	35 (9,6%)	20 (11,6%)	15 (9,9%)	0 (0%)	0,105
Não	230(63,2%)	119 (67,6%)	91 (59,9%)	36 (100%)	
<b>Outras</b>					
Sim	22 (6,2%)	9 (5,1%)	11 (7,23%)	2 (5,5%)	0,692
Não	334(91,7%)	167(94,9%)	141 (92,3%)	34 (94,4%)	

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, AVC: Acidente Vascular Cerebral; DCV: Doença Cerebrovascular; DTC: Doppler Transcraniano, Outras: Ataque isquêmico transitório, Infarto silencioso e Moya Moya

\*Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

Quanto as variáveis clínicas, dentro das análises referentes ao polimorfismo rs243865 do gene *MMP2* no modelo codominante de herança foi possível notar que a ocorrência de AVC dentro do grupo de homozigotos selvagem CC foi predominante em relação aos grupos de heterozigotos CT e de homozigotos mutados TT, tendo uma prevalência de 21/24 (87,5%) indivíduos acometidos frente a 3/24 (12,5%) (CT) e 0/24 (0%) (TT). Em relação ao acometimento por DCV e Outras complicações (Ataque isquêmico transitório, infarto silencioso e Moya – Moya) notou-se o mesmo padrão, onde, indivíduos CC e CT foram mais acometidos que os indivíduos TT.

Em relação ao polimorfismo rs17576 do gene *MMP9* foi notado um padrão semelhante, onde a ocorrência de AVC dentro do grupo homozigotos selvagens AA e heterozigotos AG apresentaram maior predominância em relação ao grupo de homozigotos mutados GG, tendo uma prevalência de 12/24 (50%) (AA) e 11/24 (45,8%) (AG) frente a 1/24 (4,2%) (GG). Assim como no polimorfismo rs243865, também foi observada uma predominância do acometimento pela DCV e outras complicações pelos indivíduos AA e AG frente aos indivíduos GG (Tabela 6). Apesar das observações, nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada correlacionando ambos os polimorfismos com as complicações cerebrovasculares independente do modelo de herança aplicado.

**Tabela 6:** Comparação da prevalência das complicações cerebrovasculares em relação aos polimorfismos e seus respectivos genótipos.

		Prevalência AVC (n=24)	Prevalência DCV (n=35)	Prevalência Outras complicações (n=22)
<b>rs243865</b>	CC	21/24 (87,5%)	27/35 (77,1%)	16/22 (72,7%)
	CT	3/24(12,5%)	6/35 (17,1%)	6/22 (27,3%)
	TT	0/24 (0%)	2/35 (5,7%)	0/22 (0%)
<b>rs17576</b>	AA	12/24 (50%)	20/35 (57,1%)	9/22 (40,9%)
	AG	11/24 (45,8%)	15/35 (42,8%)	11/22 (50%)
	GG	1/24 (2,8%)	0/35 (0%)	2/22 (9,09%)

AVC: Acidente Vascular Cerebral; DCV: Doença Cerebrovascular; Outras: Ataque isquêmico transitório, Infarto silencioso e Moya Moya.

## 6. Discussão

As metaloproteinases de matriz (MMP's), são expressas em diversos órgãos e tecidos e apresentam participação em processos como proliferação e diferenciação celular, angiogênese, processos de cicatrização e apoptose, dessa forma elas também se relacionam com diversos processos patológicos como crescimento tumoral, metástase, arteriosclerose e infarto agudo do miocárdio. As metaloproteinases de matriz 2 e 9 (gelatinases), vem sendo associadas a diversas patologias de cunho cerebrovasculares e neuroinflamatórios (Das; Amin; Jha, 2021; Sánchez-Torres et al., 2020; Yan et al., 2021).

Complicações cerebrovasculares, como o AVC do tipo isquêmico, possuem uma fisiopatologia de caráter multifatorial, onde diversos fatores podem contribuir para o seu desenvolvimento, incluindo modulações genéticas. Estudos apontam que as gelatinases, principalmente devido a inflamação gerada pela isquemia local, estão envolvidas no processo do AVC através de ações como remodelação tecidual e vascular. Além disso polimorfismos em ambos os genes das gelatinases (*MMP2* e *MMP9*) também estão envolvidos com o risco de desenvolvimento dessa complicação (Chang; Stanfill; Pourmotabbed, 2016; Dofara; Chang; Diorio, 2020; Kurzepa et al., 2014; Nie; Wang; Tang, 2014).

Em pacientes com AF, complicações de caráter neurológico estão relacionadas com um alto nível de mortalidade, o AVC em especial é a complicação neurológica mais comum entre esses pacientes, principalmente os pediátricos. De forma geral, o aumento da adesividade eritrocitária, ativação endotelial e aumento da produção de mediadores da inflamação e diminuição da biodisponibilidade do NO colaboram para o seu desenvolvimento (Aggeli et al., 2021; Ghafuri et al., 2022; Kwiatkowski et al., 2019).

Os nossos resultados demonstraram que, dentro da nossa coorte, apesar da predominância de pacientes acometidos pelo AVC com o genótipo AA e AG frente aos pacientes com genótipo GG, o polimorfismo rs17576 do gene *MMP9* não apresentou associação estatística com o desenvolvimento de nenhuma complicação cerebrovascular entre os pacientes pediátricos com AF independente do modelo aplicado ( $p < 0,05$ ). Quando o contexto é associação do polimorfismo rs17576 com complicações cerebrovasculares, na literatura é possível encontrar uma gama de

resultados promissores como por exemplo os resultados encontrados por Wang et al. que demonstrou que o polimorfismo rs17576 estava envolvido com maiores riscos de hemorragia subaracnóidea, principalmente em pacientes que possuíam o hábito do tabagismo (Wang, 2018); já Sheikhvatan et al nos trouxe em 2018, com seu estudo em uma coorte de 1000 pacientes de população iraniana, que havia uma associação do polimorfismo rs17576 com aterosclerose coronariana, posteriormente Feng et al que também revelou em 2021 com seu estudo que englobou 400 pacientes, que esse mesmo polimorfismo estava relacionado com o aumento do risco para estenose intracraniana, (Feng et al., 2021). Adicionalmente, Fan et al. realizaram um estudo em que reafirmou a correlação do polimorfismo com o AVC do tipo isquêmico aterosclerótico (Fan et al., 2022). Frente a isso, é notório algumas variáveis que não são aplicáveis dentro da nossa coorte estudada em questão, como por exemplo, o acometimento de complicações que são mais frequentes na população adulta do que a pediátrica por envolver variáveis que são inerentes a idade como hábitos alimentares que podem levar a um quadro de dislipidemia, predispondo o paciente a aterosclerose, bem como o tabagismo. De forma geral, Feng. et al nos traz que o mecanismo e envolvimento das metaloproteinases no processo de AVC aterosclerótico é explicado pela degradação do colágeno do tipo IV, importante componente da MEC, o que facilitaria o rompimento de pequenos fragmentos da placa aterosclerótica, levando a oclusões na microcirculação. Falando-se mais especialmente do rs17576, também é hipotetizado que há uma influência na permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) (Fan et al., 2022; Feng et al., 2021). Outra variável que pode ser analisada é a divergência entre as etnias das populações estudadas, onde, a maioria dos estudos publicados é de origem europeia ou asiática.

Em contrapartida a isso Polonikov et al nos trouxeram em 2019 que o polimorfismo rs17576 não aumentou o risco para desenvolvimento de infarto cerebral quando estudado de forma isolada mas apresentou correlação quando estudado de forma conjunta através de haplótipos (Polonikov et al., 2019). Recentemente em 2023, Palmeira et. al realizaram um estudo envolvendo o polimorfismo rs17576 da MMP9, juntamente a outros polimorfismos das metaloproteinases 1,2 e 7, TIMP's 1 e 2 para investigar a influência dos polimorfismos e dos níveis de expressão dos respectivos genes com as complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com AF no

estado de Pernambuco. Assim como no nosso estudo, Palmeira et al. trouxeram que o polimorfismo rs17576 por si só não mostrou nenhuma associação com o desenvolvimento das complicações cerebrovasculares mas quando aplicado em conjunto com a expressão gênica, demonstrou-se que os genótipos AG e AG+GG apresentaram maiores níveis de expressão que o genótipo AA mesmo o polimorfismo não sendo de região promotora (Do Kleyton Palmeira et al., 2023). Os estudos de Palmeira et. al, Polonikov et al juntamente com os nossos achados nos atentam e providenciam indícios de resposta sobre a participação das metaloproteinases frente as complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com AF.

Em relação ao polimorfismo rs243865 do gene MMP2 nossos resultados mostraram também que apesar da prevalência de pacientes acometidos pelo AVC com o genótipo CC em relação ao CT e CT, não houveram associações estatísticas com nenhuma complicação cerebrovascular dentro da nossa coorte de pacientes pediátricos com AF. Estudos já apontaram que esse polimorfismo leva a bloqueio da ligação com a proteína estimulante 1 (Sp1), que é um fator de transcrição, sendo assim a presença do alelo T é associada a menores níveis de expressão da MMP2 (Chang; Stanfill; Pourmotabbed, 2016; Dofara; Chang; Diorio, 2020). Alg et al. em 2018 apontaram que a presença do polimorfismo rs243865 pode afetar a integridade vascular liderada justamente pelos menores níveis de MMP2 expressos, acarretando em um cenário crônico de estresse homeostático, já que a MMP2 atua, dentre outras funções, na integridade da BHE o que colaboraria com o desenvolvimento de complicações cerebrovasculares. Os estudos que investigam a correlação do polimorfismo rs243865 com essas complicações são também divergentes, Nie et al., Hao et al. e Kim et al. em seus respectivos estudos não encontraram nenhuma correlação com o risco de infarto cerebral, já Alg et al. esclareceu o envolvimento do polimorfismo com aneurisma e infarto aterosclerótico (Alg et al., 2018; Hao et al., 2015; Kim et al., 2020; Nie; Wang; Tang, 2014). Mais uma vez, vale salientar que nenhum desses estudos foi realizado dentro de uma coorte de pacientes com AF.

No estudo, já citado, realizado por Palmeira et al., outro polimorfismo da MMP2, que não o por nós estudado, foi incluído na pesquisa bem como os níveis de expressão da MMP2, porém nenhuma associação foi encontrada. Diferentemente dos outros estudos apontados envolvendo esse gene e o polimorfismo rs243865 foi conduzido dentro da coorte de pacientes pediátricos com AF, como já esclarecido

anteriormente. É importante ressaltar que os estudos envolvendo pacientes com AF e as metaloproteinases ainda são recentes e sabe-se que o contexto da doença promove um cenário fisiopatológico extremamente inflamatório e diversificado entre os pacientes, sendo assim a continuidade dos estudos para melhor entendimento dos diversos desfechos clínicos envolvidos seguem sendo de suma importância.

Ao partirmos para as análises de associação com as variáveis laboratoriais, o polimorfismo rs243865 do gene MMP2 não se mostrou associado com nenhuma das variáveis em discussão. Já em relação ao polimorfismo rs17576 do gene MMP9 foi encontrada uma associação com o número de células vermelhas (RBC) com um  $p=0,032$ , com a BT com um  $p=0,003$  e BI com  $p=0,007$ , na literatura do papel de ambas as gelatinases é muito bem estabelecida como sendo principalmente modeladoras da matriz extracelular (MEC). De forma geral, as gelatinases podem estar envolvidas no processo de reparação tecidual após dano hepático, bem como em processos de fibrose e carcinoma hepático (Chen et al., 2022; Du et al., 2022; Grosse-Segerath; Lammert, 2021; Jiang et al., 2021). As variáveis laboratoriais incluídas no estudo são incluídas baseadas no contexto da doença que caracteriza-se por seu caráter hemolítico e inflamatório. A bilirrubina indireta é um importante marcador de hemólise e apesar de na literatura até o dado momento nenhuma evidência da participação das gelatinases em processos hemolíticos ter sido relatada, hipotetizamos que esse achado possa apontar para uma direção em que o polimorfismo rs17576 talvez possa estar relacionado, ao invés da participação no desenvolvimento das complicações cerebrovasculares, a um perfil mais hemolítico da doença podendo atuar de forma protetiva ou como fator de risco. Ainda há ,também, a possibilidade de os resultados apontarem para uma associação estatística mas não necessariamente biológica. Sendo assim, nossos achados abrem possíveis caminhos para novos estudos que envolvam as respectivas variáveis com novos direcionamentos para melhor compreensão da participação tanto da MMP2 como da MMP9 na AF.

Apesar de não ter sido encontrada a associação que esperávamos entre os polimorfismos e as complicações cerebrovasculares na nossa coorte proposta, reiteramos a importância da existência de trabalhos que avaliem o impacto de moduladores genéticos no curso clínico de pacientes com AF, incluindo também a associação da velocidade do DTC, já que a produção de trabalhos nesse contexto

ainda pode ser considerada relativamente escassa. Somado a isso, nossos resultados ainda apontaram que dos 24 pacientes que desenvolveram AVC, 7 possuíam o DTC normal, reforçando a ideia trazida por Adam et. al. em seus estudos de 2004, 1997 e 1998, onde concluiu-se que pacientes com DTC normal poderiam sim vir a desenvolver a complicação, achado esse reafirmado por Hirtz e Kirkham em 2019 (Adams et Al., 2004, 1997, 1998; Hirtz; Kirkham, 2019). O que seria uma problemática pois seguindo o protocolo estabelecido pela Sociedade Brasileira de Hematologia, pacientes com DTC normal não são submetidos a terapia de prevenção de AVC e apenas seguem realizando o DTC anualmente (Debaun et al., 2020). Sendo assim, a investigação de modulares genéticos das complicações cerebrovasculares na AF continuam sendo de suma importância pois, além de melhor elucidar o processo fisiopatológico da doença, eles podem atuar, junto ao DTC, como ferramenta de melhor condução clínica dos pacientes.

## 7. Conclusões

- O polimorfismo rs243865 do gene *MMP2* e o polimorfismo rs17576 do gene *MMP9* não se mostraram associados com o desenvolvimento de nenhuma complicação cerebrovascular em indivíduos pediátricos com AF acompanhados pelo Programa de Triagem Neonatal do HEMOPE.
- O polimorfismo rs243865 do gene *MMP2* não se mostrou associado com as variáveis laboratoriais incluídas no estudo dentro da coorte em questão.
- O polimorfismo rs17576 do gene *MMP9* mostrou-se associado com três variáveis laboratoriais em indivíduos pediátricos com AF acompanhados pelo Programa de Triagem Neonatal do HEMOPE, o que pode apontar para um possível envolvimento com o perfil hemolítico da doença, podendo ser um futuro objeto de estudo.

## 8. Referências

ADAMS, R. et al. Stroke and conversion to high risk in children screened with transcranial Doppler ultrasound during the STOPstudy. **Blood**, v. 103, n. 10, p. 3689–3694, 2004.

ADAMS, R. J. et al. Long-term stroke risk in children with sickle cell disease screened with transcranial Doppler. **Annals of Neurology**, v. 42, n. 5, p. 699–704, 1997.

ADAMS, R. J. et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 1, p. 5–11, 1998.

AGGELI, C. et al. Stroke and presence of patent foramen ovale in sickle cell disease. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 52, n. 3, p. 889–897, 2021.

AKOL, I. et al. MMP2 and MMP9 Activity Is Crucial for Adult Visual Cortex Plasticity in Healthy and Stroke-Affected Mice. **Journal of Neuroscience**, v. 42, n. 1, p. 16–32, 2022.

ALG, V. S. et al. Association of functional MMP-2 gene variant with intracranial aneurysms: case-control genetic association study and meta-analysis. **British Journal of Neurosurgery**, v. 32, n. 3, p. 255–259, 2018.

ALLALI, S. et al. Chronic organ injuries in children with sickle cell disease. **Haematologica**, v. 106, n. 6, p. 1535–1544, 2021.

ATAGA, K. I.; RAI, P. Drug Therapies for the Management of Sickle Cell Disease. **F1000Research**, v. 9, p. 1–15, 2020.

BABALOLA, O. A. et al. Haematological indices of sickle cell patients with chronic leg ulcers on compression therapy. **African Journal of Laboratory Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2021.

BALLAS, S. K. Sickle cell disease: Classification of clinical complications and approaches to preventive and therapeutic management. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 68, n. 2–3, p. 105–128, 2018.

BASSIOUNI, W.; ALI, M. A. M.; SCHULZ, R. Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. **FEBS Journal**, v. 288, n. 24, p. 7162–7182, 2021.

BELADI MOGHADAM, N. et al. The effects of memantine on the serum concentrations of matrix metalloproteinases and neurologic function of patients with ischemic stroke. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 90, p. 268–272, 2021.

BERNAUDIN, F. et al. Biological impact of  $\alpha$  genes,  $\beta$  haplotypes, and G6PD activity in sickle cell anemia at baseline and with hydroxyurea. **Blood Advances**, v. 2, n. 6, p. 626–637, 2018.

BRANDOW, A. M.; LIEM, R. I. Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2022.

CABRAL-PACHECO, G. A. et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 1–53, 2020.

CEROFOLINI, L.; FRAGAI, M.; LUCHINAT, C. Mechanism and Inhibition of Matrix Metalloproteinases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 15, p. 2609–2633, 2018.

CHANG, J. J.; STANFILL, A.; POURMOTABBED, T. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in ischemic stroke. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, 2016.

CHEN, Y. et al. Key Genes Associated With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Polycystic Ovary Syndrome. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, n. May, p. 1–10, 2022.

CHIANUMBA, R. I. et al. Outcome of Hydroxyurea Use in SCD and Evaluation of Patients' Perception and Experience in Nigeria. **Frontiers in Genetics**, v. 13, n. March, p. 1–10, 2022.

CROW, A. Transcranial Doppler in children with sickle cell disease: Five years' of screening experience. **Australasian Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 23, n. 1, p. 39–46, 2020.

DARBARI, D. S.; SHEEHAN, V. A.; BALLAS, S. K. The vaso-occlusive pain crisis in sickle cell disease: Definition, pathophysiology, and management. **European Journal of Haematology**, v. 105, n. 3, p. 237–246, 2020.

DARSHANA, T.; REES, D.; PREMAWARDHENA, A. Hydroxyurea and blood transfusion therapy for Sickle cell disease in South Asia: inconsistent treatment of a neglected disease. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2021.

DAS, S.; AMIN, S. A.; JHA, T. Inhibitors of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) for the management of hematological malignancies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 223, p. 113623, 2021.

DEBAUN, M. R. et al. American Society of Hematology 2020 guidelines for sickle cell disease: Prevention, diagnosis, and treatment of cerebrovascular disease in children and adults. **Blood Advances**, v. 4, n. 8, p. 1554–1588, 2020.

DO KLEYTON PALMEIRA et al. Polymorphisms and gene expression of metalloproteinases and their inhibitors associated with cerebral ischemic stroke in young patients with sickle cell anemia. **Molecular Biology Reports**, n. 0123456789, 2023.

DOFARA, S. G.; CHANG, S. L.; DIORIO, C. Gene polymorphisms and circulating levels of MMP-2 and MMP-9: A review of their role in breast cancer risk. **Anticancer Research**, v. 40, n. 7, p. 3619–3631, 2020.

DONG, M.; MCGANN, P. T. Changing the Clinical Paradigm of Hydroxyurea Treatment for Sickle Cell Anemia Through Precision Medicine. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 109, n. 1, p. 73–81, 2021.

DU, D. et al. Metabolic dysregulation and emerging therapeutical targets for hepatocellular carcinoma. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 12, n. 2, p. 558–580, 2022.

ELGEBALY, M. M.; ARREGUIN, J.; STORKE, N. Targets, Treatments, and Outcomes Updates in Diabetic Stroke. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 28, n. 6, p. 1413–1420, 2019.

ESTCOURT, L. J. et al. Blood transfusion for preventing primary and secondary stroke in people with sickle cell disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2020, n. 7, 2020.

FAN, D. et al. MMP9 SNP and MMP SNP–SNP interactions increase the risk for ischemic stroke in the Han Hakka population. **Brain and Behavior**, v. 12, n. 2, p. 1–10, 2022.

FASOLA, F. A. et al. The Effect of Alpha Thalassemia, HbF and HbC on Haematological Parameters of Sickle Cell Disease Patients in Ibadan, Nigeria. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2022.

FENG, X. et al. MMP9 rs17576 Is Simultaneously Correlated with Symptomatic Intracranial Atherosclerotic Stenosis and White Matter Hyperintensities in Chinese Population. **Cerebrovascular Diseases**, v. 50, n. 1, p. 4–11, 2021.

FERRONE, F. A. Targeting HbS Polymerization. **Seminars in Hematology**, v. 55, n. 2, p. 53–59, 2018.

FLANAGAN, J. M. et al. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 117, n. 24, p. 6681–6684, 2011.

FLANAGAN, J. M. et al. Genetic mapping and exome sequencing identify 2 mutations associated with stroke protection in pediatric patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 121, n. 16, p. 3237–3245, 2013.

GAO, N. et al. Association of the MMP-9 polymorphism and ischemic stroke risk in southern Chinese Han population. **BMC Neurology**, v. 19, n. 1, p. 4–9, 2019.

GEMEL, J. et al. Circulating Small Extracellular Vesicles May Contribute to Vaso-Occlusive Crises in Sickle Cell Disease. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 3, 2022.

GHAFFURI, D. L. et al. Establishing Sickle Cell Disease Stroke Prevention Teams in Africa is Feasible: Program Evaluation Using the RE-AIM Framework. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 44, n. 1, p. E56–E61, 2022.

GRAZIADEI, G. et al. Transfusional Approach in Multi-Ethnic Sickle Cell Patients: Real-World Practice Data From a Multicenter Survey in Italy. **Frontiers in Medicine**, v. 9, n. March, 2022.

GROSSE-SEGERATH, L.; LAMMERT, E. Role of vasodilation in live regeneration and health. **Biological Chemistry**, v. 402, n. 9, p. 1009–1019, 2021.

HAN, H.; HENSCH, L.; TUBMAN, V. N. Indications for transfusion in the management of sickle cell disease. **Hematology (United States)**, v. 2021, n. 1, p. 696–703, 2021.

HAO, Y. et al. Association between matrix metalloproteinase gene polymorphisms and development of ischemic stroke. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 9, p. 11647–11652, 2015.

HASSON, C. et al. The role of hydroxyurea to prevent silent stroke in sickle cell disease: Systematic review and meta-analysis. **Medicine (United States)**, v. 98, n. 51, p. 1–6, 2019.

HEBBEL, R. P.; BELCHER, J. D.; VERCELLOTTI, G. M. The multifaceted role of ischemia/reperfusion in sickle cell anemia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 3, p. 1062–1072, 2020.

HIRTZ, D.; KIRKHAM, F. J. Sickle Cell Disease and Stroke. **Pediatric Neurology**, v. 95, p. 34–41, 2019a.

HIRTZ, D.; KIRKHAM, F. J. Sickle Cell Disease and Stroke. **Pediatric Neurology**, v. 95, n. 25, p. 34–41, 2019b.

INUSA, B. P. D. et al. Sickle cell disease—genetics, pathophysiology, clinical presentation and treatment. **International Journal of Neonatal Screening**, v. 5, n. 2, 2019.

J.M., F. et al. Validation of genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 116, n. 21, p. 6681–6685, 2010.

JANG, T. et al. Vaso-occlusive crisis in sickle cell disease: a vicious cycle of secondary events. **Journal of Translational Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2021.

JIANG, K. et al. Exosomal ANGPTL1 attenuates colorectal cancer liver metastasis by regulating Kupffer cell secretion pattern and impeding MMP9 induced vascular leakiness. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 40, n. 1, p. 1–13, 2021.

KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 1–22, 2018.

KIJA, E. N. et al. Transcranial Doppler and Magnetic Resonance in Tanzanian Children with Sickle Cell Disease. **Stroke**, v. 50, n. 7, p. 1719–1726, 2019.

KIM, Y. J. et al. Are genetic variants associated with the location of cerebral arterial

lesions in stroke patients? **Cerebrovascular Diseases**, v. 49, n. 3, p. 262–268, 2020.  
KIRKHAM, F. J.; LAGUNJU, I. A. Epidemiology of stroke in sickle cell disease. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 18, 2021.

KURZEPA, J. et al. The significance of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the ischemic stroke. **International Journal of Neuroscience**, v. 124, n. 10, p. 707–716, 2014.

KWIATKOWSKI, J. L. et al. Ischemic stroke in children and young adults with sickle cell disease in the post-STOP era. **American Journal of Hematology**, v. 94, n. 12, p. 1335–1343, 2019.

LARONHA, H. et al. Challenges in matrix metalloproteinases inhibition. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, 2020.

LINDER, G. E.; CHOU, S. T. Red cell transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. **Haematologica**, v. 106, n. 7, p. 1805–1815, 2021.

MAHMOOD, A. K. et al. The MMP9 rs17576 A>G polymorphism is associated with increased lumbopelvic pain-intensity in pregnant women. **Scandinavian Journal of Pain**, v. 18, n. 1, p. 93–98, 2018.

MONTANER, J. et al. Matrix metalloproteinases and ADAMs in stroke. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 16, p. 3117–3140, 2019.

NEMBAWARE, V. et al. The Sickle Cell Disease Ontology: Enabling Collaborative Research and Co-Designing of New Planetary Health Applications. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 24, n. 10, p. 559–567, 2020.

NIE, S. W.; WANG, X. F.; TANG, Z. C. Correlations between MMP-2/MMP-9 promoter polymorphisms and ischemic stroke. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 2, p. 400–404, 2014.

OFORI-ACQUAH, S. F. Sickle cell disease as a vascular disorder. **Expert Review of Hematology**, v. 00, n. 00, p. 1–9, 2020.

OLATUNYA, O. S. et al. Influence of alpha thalassemia on clinical and laboratory parameters among nigerian children with sickle cell anemia. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 33, n. 2, p. 10–12, 2019.

ONIMOE, G.; ROTZ, S. Sickle cell disease: A primary care update. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 87, n. 1, p. 19–27, 2020.

PHILLIPS, S. M. et al. Identified barriers and facilitators to stroke risk screening in children with sickle cell anemia: results from the DISPLACE consortium. **Implementation Science Communications**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2021.

PIRENNE, F.; FLOCH, A.; HABIBI, A. How to avoid the problem of erythrocyte alloimmunization in sickle cell disease. [s.d.].

POLONIKOV, A. et al. Matrix metalloproteinases as target genes for gene regulatory networks driving molecular and cellular pathways related to a multistep pathogenesis of cerebrovascular disease. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 10, p. 16467–16482, 2019.

POMPEO, C. M. et al. Clinical-Epidemiological Characteristics and Mortality in Patients with Sickle Cell Anemia: A Retrospective Cohort Study of 1980 at 2018. **International Journal of General Medicine**, v. 15, n. February, p. 1057–1074, 2022.

REHMAN, R. et al. Recurrent Hyperhemolysis Syndrome in Sickle Cell Disease. **Cureus**, v. 13, n. 5, p. 13–15, 2021.

REMPE, R. G.; HARTZ, A. M. S.; BAUER, B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 36, n. 9, p. 1481–1507, 2016.

SABARENSE, A. P. et al. 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**, n. xx, p. 1–7, 2021.

SÁNCHEZ-TORRES, J. L. et al. Matrix metalloproteinases deregulation in amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 419, p. 117175, 2020.

SECK, M. et al. Transfusion Practice, Post-Transfusion Complications and Risk Factors in Sickle Cell Disease in Senegal, West Africa. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2022.

SOLIMAN, A. T.; ALAARAJ, N.; YASSIN, M. The effects of treatment with blood transfusion, iron chelation and hydroxyurea on puberty, growth and spermatogenesis in sickle cell disease (Scd): A short update. **Acta Biomedica**, v. 92, n. 4, 2021.

STEINBERG, M.; STATES, U. **Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia** From the Department of Medicine , Division of Hematology / Oncology , Center of Excellence for Sickle Cell Disease , Center for Regenerative Medicine , Genome Science Institute , Boston University School of Medicine . 2021.

STOTESBURY, H. et al. Vascular instability and neurological morbidity in sickle cell disease: An integrative framework. **Frontiers in Neurology**, v. 10, n. AUG, p. 1–21, 2019.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease - Elsevier Medical Artwork. **Annual Review of Pathology**, n. October, p. 261–290, 2018.

TALHA, M. et al. Pediatric Sickle Cell Disease in Sudan: Complications and Management. **Anemia**, v. 2022, p. 1–8, 2022.

WANG, Q.; ZENNADI, R. The role of rbc oxidative stress in sickle cell disease: From the molecular basis to pathologic implications. **Antioxidants**, v. 10, n. 10, 2021.

YAN, Y. et al. Association of MMP2 and MMP9 gene polymorphisms with the recurrent spontaneous abortion: A meta-analysis. **Gene**, v. 767, p. 145173, 2021.

ZHANG, J. et al. Regulation of matrix metalloproteinases 2 and 9 in corneal neovascularization. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 95, n. 5, p. 485–492, 2020.

## 9. Anexo I: Parecer de aprovação do Comitê de Ética



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise da associação de polimorfismos nos genes MMP2 e MMP9 e dos níveis séricos das metaloproteinases 2 e 9 com complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com anemia falciforme

**Pesquisador:** DANIZIA MENEZES DE LIMA SILVA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 48405221.9.0000.5208

**Instituição Proponente:** CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.856.530

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de dissertação da discente DANÍZIA MENEZES DE LIMA SILVA orientanda do Professor MARCOS ANDRÉ CAVALCANTI BEZERRA vinculado ao Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O projeto será desenvolvido no Laboratório Central do Centro de Biociências da UFPE e tendo como Instituição coparticipante a Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE). A proposta consiste basicamente na análise da hipótese: os polimorfismos de região promotora dos genes MMP2 e MMP9, bem como os níveis séricos de suas respectivas proteínas, estejam associados ao desenvolvimento das complicações cerebrovasculares na Anemia Falciforme (AF) em determinado grau. Assim, poderiam atuar com um recurso de melhor entendimento da fisiopatologia do Acidente vascular encefálico na AF e como ferramenta de condução clínica juntamente ao Doppler Transcraniano (DTC). Para este fim realizar-se-á um estudo do tipo coorte retrospectivo com comparação interna de grupos, onde os pacientes serão classificados de acordo com o acometimento ou não pela manifestação clínica do AVE apresentadas durante o seguimento no HEMOPE. As análises serão então feitas comparando os indivíduos que apresentaram a complicação clínica com aqueles que não apresentaram. Os critérios de inclusão e exclusão esta devidamente delineados. A amostra será constituída de 300 pacientes pediátricos portadores de anemia falciforme (Hb SS), cadastrados e acompanhados no ambulatório do Programa de Triagem

**Endereço:** Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde

**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600

**UF:** PE **Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-8588

**E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 19 de Julho de 2021

Assinado por:  
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO  
(Coordenador(a))

## **Anexo II – Termos de Consentimento livre e Esclarecido**

### **TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE 12 A 17 ANOS (Resolução 466/12)**

Convidamos você (após o consentimento do (a) seu/sua pai/mãe ou responsável legal) para participar, como voluntário (a), da pesquisa “Análise da associação de polimorfismos nos genes MMP2 e MMP9 e dos seus níveis de expressão gênica com complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com anemia falciforme”, que está sob a responsabilidade do pesquisador Danízia Menezes de Lima Silva ((81) 99660-8723 – danizia.menezesls@gmail.com e sob a orientação do professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra ((81) 99800-8105 - macbezerra@bol.com.br). Também participam desta pesquisa: Dr. Aderson da Silva Araújo ((81) 99976-5136 - aderson@hotlink.com.br), Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo ((81) 99800-9382 - araujoarl@hotmail.com) Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Você tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer 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 em suas atividades do dia a dia. Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, a identificação de alterações genéticas na anemia falciforme permitirá a detecção precoce de eventos cerebrovasculares, levando a melhoria do serviço prestado e ao aumento da qualidade de vida dos pacientes. Dessa forma, gostaríamos que você doasse 5 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. 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 (entrevistas e dados laboratoriais) ficarão armazenados em computador pessoal sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos. Nem o (a) Sr. (a), nem seu/sua pai/mãe ou responsável legal, pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

---

(Assinatura do pesquisador)

## ASSENTIMENTO DO (A) MENOR PARA A PARTICIPAÇÃO COMO VOLUNTÁRIO (A)

### Pesquisa de Polimorfismos no Gene *TEK* em Pacientes com Anemia Falciforme e Acidente Vascular Cerebral.

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar no estudo “Análise da associação de polimorfismos nos genes MMP2 e MMP9 e dos seus níveis de expressão gênica com complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com anemia falciforme”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade para mim ou para meu/minha pai/mãe ou responsável legal.

\_\_\_\_\_  
Local e data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do (a) menor

Impressão digital

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar:

NOME	ASSINATURA
NOME	ASSINATURA

**TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO RESPONSÁVEIS PELOS MENORES DE 18 ANOS (Resolução 466/12)**

Convidamos o (a) seu/sua filho (a) ou menor de idade que está sob sua responsabilidade para participar, como voluntário (a), da pesquisa “Análise da associação de polimorfismos nos genes MMP2 e MMP9 e dos seus níveis de expressão gênica com complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com anemia falciforme. ”, que está sob a responsabilidade do pesquisador pesquisador Danízia Menezes de Lima Silva ((81) 99660-8723 – danizia.menezesls@gmail.com), e sob a orientação do professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra ((81) 99800-8105 - macbezerra@bol.com.br). Também participam desta pesquisa: Dr. Aderson da Silva Araújo ((81) 99976-5136 - aderson@hotlink.com.br), Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo ((81) 99800-9382 - araujoarl@hotmail.com)

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar que seu/sua filho (a) faça parte do estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, nem o (a) Sr. (a) ou o (a) seu/sua filho (a) serão penalizados (as) de forma alguma. O (A) Sr. (a) tem o direito de retirar o consentimento da participação dele (a) a qualquer tempo, sem qualquer 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 em suas atividades do dia a dia. Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, a identificação de alterações genéticas na anemia falciforme permitirá a detecção precoce de eventos cerebrovasculares, levando a melhoria do serviço prestado e ao aumento da qualidade de vida dos pacientes. Dessa forma, gostaríamos que seu/sua filho (a) doasse 5 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.

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 (entrevistas e dados laboratoriais) ficarão armazenados em computador pessoal sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para o (a) seu/sua filho (a) participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

---

(Assinatura do pesquisador)

**CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PARA A PARTICIPAÇÃO DA CRIANÇA (OU DO MENOR DE IDADE)**

Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, responsável pelo (a) menor \_\_\_\_\_, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, autorizo a sua participação no estudo Análise da associação de polimorfismos nos genes MMP2 e MMP9 e dos seus níveis de expressão gênica com complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com anemia falciforme I”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora 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 para mim ou para meu/minha filho (a).

\_\_\_\_\_  
Local e data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do (a) menor

Impressão digital

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar:

NOME	ASSINATURA
NOME	ASSINATURA

## 10. Currículo Lattes

### Identificação

	Nome
Danízia Menezes de Lima Silva 	
SILVA, D. M. L.; DE LIMA SILVA, DANÍZIA MENEZES	Nome em citações bibliográficas
 <a href="http://lattes.cnpq.br/9702278037836785">http://lattes.cnpq.br/9702278037836785</a>	Lattes ID

### Formação acadêmica/titulação

	<b>2020</b>
Mestrado em andamento em Genética (Conceito CAPES 4). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil. Título: Análise da associação de polimorfismos nos genes MMP2 e MMP9 e dos níveis séricos das metaloproteinasas 2 e 9 com complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com anemia falciforme. Orientador: /Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra. Coorientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.	
	<b>2021</b>
Especialização em andamento em Pós Graduação em Hematologia Clínica e Laboratorial. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.	
	<b>2016 - 2019</b>
Graduação em Biomedicina. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil. Título: Análise da associação do polimorfismo rs489347 do gene TEK com o desenvolvimento de doença cerebrovascular em pacientes pediátricos com anemia falciforme. Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra.	
	<b>2013 - 2015</b>
Ensino Médio (2º grau). Escola de Aplicação da UPE Campus Mata Norte Professor Chaves, EAPC, Brasil.	

### Formação Complementar

	<b>2019</b>
Monitora da turma 4b de Pós graduação em Hematologia Clínica e Laboratorial. (Carga horária: 540h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.	
	<b>2020 - 2020</b>
I Curso de Atualização em Genética Médica. (Carga horária: 20h). Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Brasil.	
	<b>2019 - 2019</b>
IV Curso de Líquidos Biológicos. (Carga horária: 20h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.	
	<b>2019 - 2019</b>
IV Curso de Citologia Hematológica Avançada. (Carga horária: 20h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.	
	<b>2019 - 2019</b>
VII Curso e Interpretação do Hemograma. (Carga horária: 25h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.	
	<b>2019 - 2019</b>

monitora do V Curso de Citologia Hematológica Avançada. (Carga horária: 20h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.	<b>2018 - 2018</b>
I Curso de Imunohematologia Laboratorial. (Carga horária: 20h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.	<b>2018 - 2018</b>
III Curso de Avaliação Clínica e Laboratorial da Hemostasia. (Carga horária: 20h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.	<b>2017 - 2017</b>
Deteção Fenotípica e Genotípica de Biofilmes Bacterianos. (Carga horária: 8h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.	<b>2017 - 2017</b>
Bioinformática. (Carga horária: 8h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.	<b>2017 - 2017</b>
Cultivo celular em pesquisa. (Carga horária: 10h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.	
Atuação Profissional	

---

### Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

	<b>vínculo institucional</b> <b>2020 - 2020</b>
Vínculo: Convidado, Enquadramento Funcional: Ministrante, Carga horária: 16	<b>Outras informações</b>
Ministrante do Minicurso de Flebotomia na XXVI Semana de Biomedicina da UFPE. otalizando uma carga horária de 16hrs.	
<b>Vínculo institucional</b>	<b>2018 - 2019</b>
Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 12	<b>Outras informações</b>
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.	
	<b>Vínculo institucional</b> <b>2018 - 2019</b>
Vínculo: Estágio extracurricular, Enquadramento Funcional: Aluno Voluntário, Carga horária: 20	<b>Outras informações</b>
Iniciação Científica Voluntária no Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial da UFPE com participação na rotina de diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias, leucemias agudas, neoplasias mieloproliferativas crônicas e desordens da hemostasia. Sendo desenvolvido paralelamente pela aluna um projeto de pesquisa voltado para a análise de polimorfismos genéticos associados ao desenvolvimento de complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com anemia falciforme sob orientação do professor Marcos André Cavalcanti Bezerra.	
	<b>Vínculo institucional</b> <b>2018 - 2018</b>
Vínculo: Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Aluno Voluntário, Carga horária: 20	<b>Outras informações</b>
Iniciação Científica no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) pelo grupo de Prospecção Molecular e Bioinformática (PROSPECMOL) coordenado pelos Profs. Drs Carlos Henrique Madeiros Castelletti e Danyelly Bruniska Gondim Martins na área de rbovirose e Bioinformática.	
	<b>Vínculo institucional</b> <b>2016 - 2018</b>
Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 12	<b>Outras informações</b>

Monitora da disciplina de Citologia/Biologia Celular vinculado a PROACAD/UFPE para os cursos de Biomedicina, Farmácia, Terapia Ocupacional, Fisioterapia, Ciências Biológicas e Ciências Ambientais. Sob orientação do Professor Paulo Antônio Padovan no Departamento de Histologia e Embriologia.

#### Vínculo institucional

**2016 - 2016**

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

#### Outras informações

Iniciação Científica voluntária pelo Laboratório de Biofísica Química da UFPE, com ênfase em Morfotecnologia.

#### Atividades

#### 06/2019 - Atual

Extensão universitária, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório Central do Centro de Biociências (LABCEN).

Atividade de extensão realizada

Liga Acadêmica de Hematologia Clínica e Laboratorial da UFPE.

Projetos de pesquisa

**2020 - Atual**

Associação de polimorfismos nos genes das metaloproteinases com complicações clínicas em pacientes com anemia falciforme

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (2) / Mestrado acadêmico: (2) / Doutorado: (1) .

Integrantes: Danízia Menezes de Lima Silva - Coordenador / Marcos André Cavalcanti Bezerra - Integrante / Ana Beatriz Lucas de Moura Rafael - Integrante / GABRIELA DA SILVA ARCANJO - Integrante.

**2018 - 2019**

Análise da associação do polimorfismo rs489347 do gene TEK com o desenvolvimento de doença cerebrovascular em pacientes pediátricos com anemia falciforme

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (2) / Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Danízia Menezes de Lima Silva - Coordenador / Marcos André Cavalcanti Bezerra - Integrante / Ana Beatriz Lucas de Moura Rafael - Integrante / GABRIELA DA SILVA ARCANJO - Integrante.

Projetos de extensão

**2019 - Atual**

Liga Acadêmica de Hematologia Clínica e Laboratorial da UFPE

Descrição: Membro fundador e ex diretora da Liga Acadêmica de Hematologia Clínica e Laboratorial (LHCL). A LHCL é um 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: Em andamento; Natureza: Extensão.  
Alunos envolvidos: Graduação: (26) .

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

Áreas de atuação

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Hematologia. **2.**  
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Morfologia / Subárea: Citologia hematológica..  
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Biologia Molecular. **4.**  
Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: hematologia.

1.

Idiomas

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem. **inglês**  
Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem. **Espanhol**  
Compreende Pouco, Fala Pouco, Lê Pouco, Escreve Pouco. **Português**

Produções

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

HATZLHOFER, BETÂNIA LUCENA DOMINGUES PEREIRA-MARTINS, DIEGO ANTONIO DE FARIAS DOMINGOS, IGOR ARCANJO, GABRIELA DA SILVA WEINHÄUSER, ISABEL FALCÃO, DIEGO ARRUDA FARIAS, ISABELA CRISTINA CORDEIRO DE FREITAS BATISTA, JÉSSICA VITÓRIA GADELHA PRADO, LUANA PRISCILLA LARANJEIRA OLIVEIRA, JÉSSICA MARIA FLORENCIO BATISTA, THAIS HELENA CHAVES SOBREIRA, MARCONDES JOSÉ DE VASCONCELOS COSTA DE SANTANA, RODRIGO MARCIONILO ARAÚJO, AMANDA BEZERRA DE SÁ DE MELO, MANUELA ALBUQUERQUE DE ANCÂNTARA, BRUNA VASCONCELOS COELHO-SILVA, JUAN LUIZ DE MOURA RAFAEL, ANA BEATRIZ LUCAS **DE LIMA SILVA, DANÍZIA MENEZES** ALBUQUERQUE, FLÁVIA PEIXOTO SANTOS, MAGNUN NUELDO NUNES DOS ANJOS, ANA CLÁUDIA COSTA, FERNANDO FERREIRA DA SILVA ARAÚJO, ADERSON LUCENA-ARAÚJO, ANTONIO ROBERTO , *et al.* ; Alpha thalassemia, but not  $\beta$ S-globin haplotypes, influence sickle cell anemia clinical outcome in a large, single-center Brazilian cohort. ANNALS OF HEMATOLOGY, v. 100, p. 74, 2021.

1.

Citações:/1

#### Resumos publicados em anais de congressos

**HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.**; RAFAEL, A.B.L.M ; ARCANJO, G. S. ; ARAUJO, A. B. S. ; ALCANTARA, B. V. ; MELO, M. A. ; ARAUJO, A. S. ; ANJOS, A. C. D. ; BEZERRA, MAC ; ARAUJO, A. R. L. . Associação do polimorfismo rs489347 do gene TEK com o desenvolvimento de doença cerebrovascular em pacientes pediátricos com anemia falciforme. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia HEMO 2020, 2020, Campinas, SP. Hematology, Cell Transfusion and Cell Therapy, 2020, 2020. v. v. 42.

1.

**HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.**; RAFAEL, A.B.L.M . Aplicabilidade da plasmaférese em paciente com

2.

purpura trombocitopênica trombótica e a importância da interpretação do hemograma - um relato de caso. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia HEMO 2020, 2020, Campinas, SP. Hematology, Cell Transfusion and Cell Therapy, 2020, 2020. v. v. 42.

3.

**HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.**; RAFAEL, A.B.L.M ; SILVA, D.B.S. ; AGUIAR, A.M.G ; BANDEIRA, M.L.S. ; NOGUEIRA, J.E.S ; MACEDO, B. G. S. ; BARROS, C. G. C. ; BEZERRA, MAC . Liga Acadêmica de Hematologia Clínica e Laboratorial da UFPE (LHCL): Um relato de experiência sobre a importância da multidisciplinaridade na hematologia. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia HEMO 2020, 2020, Campinas, SP. Hematology, Cell Transfusion and Cell Therapy, 2020, 2020. v. v. 42.

4.

MACEDO, B. G. S. ; MELO, M. A. ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; RAFAEL, A.B.L.M ; ARAUJO, A. R. L. . Quantificação do DNA mitocondrial como marcador prognóstico em potencial para a leucemia mieloide aguda. In: I Congresso Internacional de Medicina e Saúde, 2020, São Paulo. Revista Panorâmica, 2020. v. v. 32.

MELO, M. A. ; MACEDO, B. G. S. ; RAFAEL, A.B.L.M ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; BEZERRA, MAC . Alvos em terapia gênica por CRISPR/CAS9 e suas aplicações em hemoglobinopatias: uma revisão de literatura. In: I Congresso Internacional de Medicina e Saúde, 2020. Revista Panorâmica, 2020. v. v. 32.

6.

RAFAEL, A.B.L.M ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; ARCANJO, G. S. ; ARAUJO, A. B. S. ; ALCANTARA, B. V. ; MELO, M. A. ; ARAUJO, A. S. ; ANJOS, A. C. D. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, MAC . Análise da associação do polimorfismo rs284875 do gene TGFB3 com o desenvolvimento de doença cerebrovascular em pacientes pediátricos com anemia falciforme. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia HEMO 2020, 2020, Campinas, SP. Hematology, Cell Transfusion and Cell Therapy, 2020, 2020. v. v. 42.

SANTANA, R. M ; BATISTA, T. H. C. ; SOBREIRA, M. J. V. C. ; RAFAEL, A.B.L.M ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; ARCANJO, G. S. ; ARAUJO, A. S. ; VASCONCELOS, L. R. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, MAC . AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MIRNA-221 E DO MIRNA-126 COM O DESENVOLVIMENTO DE MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia HEMO 2019, 2019, Rio de Janeiro. Hematology, Cell Transfusion and Cell Therapy, 2019. Rio de Janeiro: Hematology, Cell Transfusion and Cell Therapy, 2019, 2019. v. v. 41.

8.

BATISTA, T. H. C. ; SANTANA, R. M ; SOBREIRA, M. J. V. C. ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; ARCANJO, G. S. ; ARAUJO, A. S. ; COSTA, F. F. ; VASCONCELOS, L. R. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, MAC . Differential expression of miR-21 and miR-130a and serum leptin levels on leg ulcers development in sickle cell anemia. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia HEMO 2019, 2019, Rio de Janeiro. Hematology, Cell Transfusion and Cell Therapy, 2019. Rio de Janeiro: Hematology, Cell Transfusion and Cell Therapy, 2019, 2019. v. v. 41.

9.

SILVA, C. I. N. ; LIMA, M. B. P. L. V. ; COSTA, I. M. ; COSTA, N. C. M. ; RAFAEL, A.B.L.M ; AGUIAR, A.M.G ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; BATISTA, J. V. G. F. ; HATZLHOFFER, B. L. D. ; BEZERRA, MAC . A IMPORTÂNCIA DOS CUIDADOS PRÉ-ANALÍTICOS NO DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DE PACIENTES COM HEMOFILIA A. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia HEMO 2019, 2019, Rio de Janeiro. Hematology, Cell Transfusion and Cell Therapy, 2019. Rio de Janeiro: Hematology, Cell Transfusion and Cell Therapy, 2019, 2019. v. v. 41.

## Apresentações de Trabalho

1. **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.**; RAFAEL, A.B.L.M ; ARCANJO, G. S. ; BEZERRA, MAC ; BATISTA, J. V. G. F. ; ARAUJO, A. B. S. ; ALCANTARA, B. V. . Análise da associação do polimorfismo rs489347 do gene TEK com o desenvolvimento de doença cerebrovascular em pacientes pediátricos com anemia falciforme. 2020. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. SOBREIRA, M. J. V. C. ; MELO, M. A. ; MACEDO, B. G. S. ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; RAFAEL, A.B.L.M ; ARAUJO, A. B. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, MAC . Caracterização de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com anemia falciforme durante e após crises vaso-oclusivas. 2020. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. RAFAEL, A.B.L.M ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; ARCANJO, G. S. ; BEZERRA, MAC ; BATISTA, J. V. G. F. ; ALCANTARA, B. V. ; ARAUJO, A. B. S. . Associação do polimorfismo rs284875 do gene TGFBR3 com o desenvolvimento de doença cerebrovascular em pacientes pediátricos com anemia falciforme. 2020. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.**; RAFAEL, A.B.L.M . Leucemias : Um panorama atual. 2020. (Apresentação de Trabalho/Outra).
5. AGUIAR, A.M.G ; BANDEIRA, M.L.S. ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; RAFAEL, A.B.L.M ; SILVA, D.B.S. ; NOGUEIRA, J.E.S ; BEZERRA, MAC . Liga Acadêmica de Hematologia Clínica e Laboratorial: Experiência de abordagem multiprofissional. 2020. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
6. SANTANA, R. M ; MELO, J. P. B. ; MACEDO, B. G. S. ; ALCANTARA, B. V. ; ARAUJO, A. B. S. ; MELO, M. A. ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; BEZERRA, MAC . AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MIRNA-221 E DO MIRNA-126 COM O DESENVOLVIMENTO DE MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME. 2020. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
7. HATZLHOFER, B. L. D. ; ALCANTARA, B. V. ; ARAUJO, A. B. S. ; MELO, M. A. ; MACEDO, B. G. S. ; MELO, J. P. B. ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; BEZERRA, MAC . Influência da alfa talassemia e dos haplotipos da globina B no perfil clínico da anemia falciforme. 2020. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
8. BATISTA, T. H. C. ; SANTANA, R. M ; SOBREIRA, M. J. V. C. ; ARCANJO, G. S. ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; ARAUJO, A. S. ; COSTA, F. F. ; VASCONCELOS, L. R. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, MAC . Differential expression of miR-21 and miR-130a and serum leptin levels on leg ulcers development in sickle cell anemia. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
9. SANTANA, R. M ; BATISTA, T. H. C. ; SOBREIRA, M. J. V. C. ; RAFAEL, A.B.L.M ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; ARCANJO, G. S. ; ARAUJO, A. S. ; VASCONCELOS, L. R. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, MAC . AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MIRNA-221 E DO MIRNA-126 COM O DESENVOLVIMENTO DE MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
10. SILVA, C. I. N. ; LIMA, M. B. P. L. V. ; COSTA, I. M. ; COSTA, N. C. M. ; RAFAEL, A.B.L.M ; AGUIAR, A.M.G ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o**

**currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; BATISTA, J. V. G. F. ; HATZLHOFER, B. L. D. ; BEZERRA, MAC . A IMPORTÂNCIA DOS CUIDADOS PRÉ-ANALÍTICOS NO DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DE PACIENTES COM HEMOFILIA A. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

11.

ARCANJO, G. S. ; BATISTA, J. V. G. F. ; OLIVEIRA, J. M. F. ; ARAUJO, A. B. S. ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; RAFAEL, A.B.L.M ; ALCANTARA, B. V. ; BANDEIRA, M.L.S. ; SILVA, J. B. R. ; SANTANA, L. B. M. ; BEZERRA, MAC . AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS FOKI E CDX-2 DO GENE VDR NAS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

12.

BATISTA, J. V. G. F. ; ARCANJO, G. S. ; OLIVEIRA, J. M. F. ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; RAFAEL, A.B.L.M ; ARAUJO, A. B. S. ; BANDEIRA, M.L.S. ; AGUIAR, A.M.G ; ALCANTARA, B. V. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, MAC . ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA KL E DOS POLIMORFISMOS KL RS1207568 E KL RS9536314 COM AS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

13.

ARCANJO, G. S. ; BATISTA, T. H. C. ; SOBREIRA, M. J. V. C. ; SANTANA, R. M ; ANDRADE, A. M. G. ; ARAUJO, A. S. ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; RAFAEL, A.B.L.M ; ALCANTARA, B. V. ; BANDEIRA, M.L.S. ; BEZERRA, MAC . CARACTERIZAÇÃO DA HB M-SASKATOON (BETA 63 HIS>TIR): MUTAÇÃO DE NOVO EM PACIENTE DO RECIFE. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

14.

SOBREIRA, M. J. V. C. ; BATISTA, T. H. C. ; ARCANJO, G. S. ; SANTANA, R. M ; ARAUJO, A. B. S. ; ALCANTARA, B. V. ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; RAFAEL, A.B.L.M ; BANDEIRA, M.L.S. ; BEZERRA, MAC . CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA INTERAÇÃO DA HEMOGLOBINA S COM A HEMOGLOBINA DEER LODGE. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

15.

**HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; RODRIGUES, R. L. ; OLIVEIRA, H. L. N. L. . Aciclovir e seu espectro de ação sobre o vírus Herpes. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

16.

RODRIGUES, R. L. ; **HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; OLIVEIRA, H. L. N. L. . Efeito da amamentação de mães infectadas pelo parasita Schistosoma mansoni em camundongos descendentes adultos.. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

17.

**HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" SILVA, D. M. L.** ; CUNHA, G.G. ; FERREIRA, L.E.S. ; SANTOS, L.A. ; LIMA, R.B. . Vírus Zika e suas Complicações relacionadas a Síndrome de Guillain-Barré. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).  
Eventos

### Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1.

Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2020. Aplicabilidade da plasmaférese em paciente com purpura trombocitopênica trombótica e a importância da interpretação do hemograma - um relato de caso. 2020. (Congresso).

2.

I Congresso Internacional de Medicina e Saúde. Análise da associação do polimorfismo rs489347 do gene TEK com o desenvolvimento de doença cerebrovascular em pacientes pediátricos com anemia falciforme. 2020. (Congresso).

- I Curso de atualização em Genética Médica. 2020. (Outra). **3.**
- .II Congresso Regional em Virologia. 2020. (Congresso). **5.**
- II Encontro de Genética, Hemoterapia e Patologias Hematológicas. A influência da alfa talassemia e dos haplótipos de globina B no perfil clínico da anemia falciforme. 2020. (Congresso). **7.**
- Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2019. Differential expression of miR-21 and miR-130a and serum leptin levels on leg ulcers development in sickle cell anemia. 2019. (Congresso). **8.**
- II Curso de Inverno de Genética Humana. 2017. (Congresso). **9.**
- XII Semana da Pós Graduação em Medicina Tropical. 2017. (Simpósio). **10.**
- XXIV Semana de Biomedicina. Aciclovir e seu espectro de ação sobre o vírus Herpes. 2017. (Congresso).
- II Debate Multidisciplinar na Área de Saúde: discutindo a infecção pelo vírus Zika..Vírus Zika e suas complicações relacionadas à Síndrome de Guillain-Barré. 2016. (Simpósio).

#### Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

- 1.**  
 HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" **SILVA, D. M. L.**. XXVI Semana de Biomedicina: Saúde, Ciência e Sociedade. 2020. (Congresso).
- 2**  
 HYPERLINK "http://lattes.cnpq.br/9702278037836785" \o "Clique para visualizar o currículo" \t "\_blank" **SILVA, D. M. L.**. I Semana de Hematologia Clínica e Laboratorial. 2020. (Outro).