



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ANA CLÁUDIA MENDONÇA DOS ANJOS

MODULADORES GENÉTICOS DA DOENÇA CEREbroVASCULAR EM
POPULAÇÃO PEDIÁTRICA COM ANEMIA FALCIFORME

RECIFE

2023

ANA CLÁUDIA MENDONÇA DOS ANJOS

**MODULADORES GENÉTICOS DA DOENÇA CEREBROVASCULAR EM
POPULAÇÃO PEDIÁTRICA COM ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Prof. Dr. Igor de Farias Domingos

RECIFE

2023

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Anjos, Ana Cláudia Mendonça Dos.

Moduladores genéticos da doença cerebrovascular em população pediátrica com anemia falciforme / Ana Cláudia Mendonça Dos Anjos. - Recife, 2023.

132 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2023.

Orientação: Marcos André Cavalcanti Bezerra.

Coorientação: Igor de Farias Domingos.

Inclui referências e anexo.

1. Anemia falciforme; 2. Doença cerebrovascular; 3. Doppler transcraniano; 4. Moduladores genéticos. I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti. II. Domingos, Igor de Farias. III. Anjos, Ana Cláudia Mendonça.

ANA CLÁUDIA MENDONÇA DOS ANJOS

**MODULADORES GENÉTICOS DA DOENÇA CEREbroVASCULAR EM
POPULAÇÃO PEDIÁTRICA COM ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular. Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

Aprovada em 29/09/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Rafael Lima Guimarães
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Josefina Aparecida Pellegrini Braga
Universidade Federal de São Paulo

Prof^o. Dr. Magnun Nueldo Nunes Santos
Universidade Estadual de Campinas

RECIFE

2023

Aos pacientes portadores
de Anemia Falciforme do
Hemope.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - UFPE, pelo conhecimento e espaço cedido para o desenvolvimento da pesquisa.

À Fundação HEMOPE, em especial ao corpo clínico e principalmente aos pacientes.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra, sempre tão disponível, por ter me impulsionado a realizar este grande desafio que é o mestrado.

Ao Prof. Dr. Antônio Roberto por todo o apoio técnico e conhecimento fornecido.

À doutoranda Gabriela da Silva Arcanjo, verdadeiramente um anjo da guarda. Seu auxílio foi imprescindível na trajetória do meu mestrado. Generosidade, gentileza e competência são algumas de suas características que ficaram marcadas de forma profunda em mim.

À toda a equipe do Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial da UFPE que faz um trabalho brilhante.

Agradeço imensamente à minha família que tornou essa trajetória mais leve, sempre me incentivando a seguir sem desanimar.

Ao meu marido, sempre o maior parceiro de todas as horas e imprescindível para que eu chegasse até aqui.

Agradeço e dedico o meu mestrado e minha carreira profissional ao meu pai que, não pode realizar seu sonho de ser médico, mas foi um excelente contador, economista e professor. Como pai, exerceu sua melhor função. Obrigado, meu maior mestre. À minha mãe, que ensinou a me superar.

A Deus por sempre estar presente em minha vida, ofertando-me luz e inspiração, ao mesmo tempo em que ensina que devo ter a humildade de saber que ainda sei muito pouco.

RESUMO

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma complicação da anemia falciforme (AF), resultando em morbidade e mortalidade. Atualmente, a única ferramenta disponível para rastrear o risco de AVC em crianças com AF é o Doppler Transcraniano (DTC). Apesar de suas vantagens, a técnica apresenta limitações. Estudos sugerem que alterações em genes não relacionados à mutação primária da AF podem modular o risco para o desenvolvimento do AVC. O estudo dos polimorfismos *ANXA2* (rs11853426), *TEK* (rs489347), *TGFBR3* (rs284875), *ADCY9* (rs2238432), *ENPP1* (rs1044498), alfa talassemia (- α 3.7Kb), os haplótipos do gene da β S-globina e os níveis de hemoglobina fetal (HbF) foi realizado em 402 pacientes com AF, 47 destes com doença cerebrovascular (DCV), com mediana de idade de 14 anos em acompanhamento regular no HEMOPE. Os polimorfismos foram genotipados utilizando PCR em tempo real, a pesquisa da α -3.7-kb foi realizada por gap-PCR e a determinação dos haplótipos por PCR-RFLP. Os níveis aumentados de HbF, de Hb total e uso prévio de hidroxiuréia foram associados com a diminuição do risco do AVC ($p < 0,001$). Dos pacientes que desenvolveram AVC, observamos que 34,38% tinham DTC alterado ($p < 0,0001$). Não encontramos associação dos haplótipos, da alfa talassemia e nem dos polimorfismos estudados com a ocorrência da DCV. Estes resultados indicam que o *background* genético dos pacientes em nossa população pode alterar a influência dos moduladores genéticos da AF.

Palavras-chave: Anemia Falciforme, Doença Cerebrovascular, Doppler Transcraniano, Moduladores Genéticos.

ABSTRACT

Stroke is a complication of sickle cell anemia (FA), resulting in morbidity and mortality. Currently, the only tool available to screen stroke risk in children with SCA is Transcranial Doppler (TCD). Despite its advantages, the technique has limitations. Studies suggest that alterations in genes unrelated to the primary AF mutation may modulate the risk of developing a stroke. The study of polymorphisms ANXA2 (rs11853426), TEK (rs489347), TGFBR3 (rs284875), ADCY9 (rs2238432), ENPP1 (rs1044498), alpha thalassemia (- α 3.7Kb), the haplotypes of the β S globin gene and the levels of Fetal hemoglobin (HbF) was performed in 402 patients with AF, 47 of them with cerebrovascular disease (CVD), with a median age of 14 years undergoing regular follow-up at HEMOPE. The polymorphisms were genotyped using real-time PCR, the search for α -3.7-kb was performed by gap-PCR and the determination of haplotypes by PCR-RFLP. Increased levels of HbF, total Hb and previous use of hydroxyurea were associated with a decreased risk of stroke ($p < 0.001$). Of the patients who developed stroke, we observed that 34.38% had altered DTC ($p < 0.0001$). We found no association between haplotypes, alpha thalassemia or the selected polymorphisms with the occurrence of CVD. These results indicate that the genetic background of patients in our population may alter the influence of genetic modifiers of AF.

Key words: Sickle Cell Anemia; Cerebrovascular Disease; Transcranial Doppler; Genetic Modulators.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura da hemoglobina	18
Figura 2- Estrutura dos genes da α e β globinas	18
Figura 3- Ontogenia das hemoglobinas humanas	19
Figura 4- Mutação genética do gene <i>HBB</i> na anemia falciforme	21
Figura 5- Polímeros da HbS	22
Figura 6- Estimativa mundial de recém nascidos com anemia falciforme .	23
Figura 7- Frequência do gene S no Brasil	24
Figura 8- Fisiopatologia da anemia falciforme	26
Figura 9- Manifestações clínicas da anemia falciforme	27
Figura 10- Fenótipos da anemia falciforme	28
Figura 11- Mecanismo de inibição da polimerização da HbS pela HbF. . .	29
Figura 12- Deleção $-\alpha^{3,7kb}$	32
Figura 13- Idade média do primeiro evento da doença cerebrovascular por genótipo da doença falciforme.	33
Figura 14- Incidência por idade do risco de acidente vascular cerebral isquêmico e hemorrágico na anemia falciforme	35
Figura 15- Fisiopatologia do AVCI na anemia falciforme	37
Figura 16- Arteriopatia venoclusiva e efeitos do regime de transfusão crônico	40
Figura 17- Gráfico de amplificação da PCR em tempo real para o polimorfismo <i>TEK</i> rs489347.	60
Figura 18- Análise dos fragmentos dos polimorfismos <i>ANXA2</i> rs11853426	62
Figura 19- gapPCR para análise da deleção $-\alpha^{3,7Kb}$	63
Figura 20- Análise dos sítios polimórficos no <i>cluster</i> β	64
Quadro 1- Polimorfismos associados à doença cerebrovascular na anemia falciforme	47
Quadro 2- Resultados de estudos sobre a associação de polimorfismos à doença cerebrovascular na anemia falciforme	48
Quadro 3- Condições das reações utilizadas para amplificação das	

regiões polimórficas do <i>cluster</i> da globina β	65
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- <i>Primers</i> utilizados para amplificação do gene <i>ANXA2</i> e condições da reação de amplificação	61
Tabela 2- Sequências dos <i>primers</i> para pesquisa da deleção $\alpha^{3,7Kb}$	62
Tabela 3- <i>Primers</i> utilizados para amplificação de regiões do <i>cluster</i> β	64
Tabela 4- Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do <i>cluster</i> da globina β	65
Tabela 5- Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição	66
Tabela 6- Características laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo . . .	67
Tabela 7- Características de sexo e idade do total de pacientes e da idade do grupo da doença cerebrovascular.	68
Tabela 8- Resultados do doppler transcraniano e número de casos de AVC por categoria do doppler transcraniano	68
Tabela 9- Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs	70
Tabela 10- Frequência dos haplótipos β^s e da alfa talassemia	71
Tabela 11- Características dos pacientes com anemia falciforme de acordo com o status da doença cerebrovascular	72
Tabela suplementar 1- Estratégias terapêuticas empregadas para os pacientes com doença cerebrovascular	117

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ítem	Definições
ACI	Artéria cerebral interna
ACM	Artéria carótida interna
ADCY9	Adenilato ciclase 9
AEO	Arteriopatia estenoclusiva
AF	Anemia falciforme
AI	Árabe indiano
AIT	Ataque isquêmico transitório
α	Alfa
$\alpha^{3,7Kb}$	Deleção $\alpha^{3,7Kb}$
α -Tal	Alfa talassemia
ANGPT2	Gene da angiopoetina
ANXA2	Anexina A2
AR	Alto risco
ARM	Angiorressonância
AVC	Acidente vascular cerebral
AVCH	Acidente vascular cerebral hemorrágico
AVCI	Acidente vascular cerebral isquêmico
β	Beta
β^s	Cadeia globínica beta com alteração para formação da HbS
BEN	Benin
BI	Bilirrubina indireta
BR	Baixo risco
CA	Crise álgica
CAR	República central africana
CAM	Camarões
CHF	Concentrado de hemácias fenotipadas
cm/s	Centímetro por segundo
DCV	Doença cerebrovascular

DF	Doença falciforme
DHL	Desidrogenase láctica
DTC	Doppler transcraniano
ENPP1	Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 1
EPO	Eritropoetina
EUA	Estados unidos das américas
Fe ^{**}	Ferro ferroso
Fe ^{***}	Ferro férrico
FSC	Fluxo sanguíneo cerebral
Y	Gama
GOLGB1	Golgina B1
GTP	Guanosina trifosfato
Hb	Hemoglobina
HBB	Gene da globina beta
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
Hc	Hemácia
Ht	Hematócrito
HU	Hidroxiuréia
ICAN-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-8	Interleucina 8
IS	Infarto silencioso
Kb	Kilobase
LCR	do inglês <i>locus control region</i>
MAF	do inglês <i>minor allele frequency</i>
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NO	Óxido nítrico
Nos	NO sintetase
O ²	Oxigênio
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>

PGF	Fator de crescimento plaquetário
PHHF	Persistência hereditária da hemoglobina fetal
RC	Risco condicional
RNM	Ressonância magnética
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RTC	Regime de transfusão crônica
S β -talassemia	Genótipo heterozigoto composto para hemoglobina S e β -talassemia
S β^+ -talassemia	Genótipo heterozigoto composto para hemoglobina S e β^+ -talassemia
S β^0 -talassemia	Genótipo heterozigoto composto para hemoglobina S e β^0 -talassemia
SC	Genótipo heterozigoto composto para hemoglobinas SC
SD	Genótipo heterozigoto composto para hemoglobinas SD
SEN	Senegal
SS	Genótipo heterozigoto composto para hemoglobinas SS
STA	Síndrome torácica aguda
STOP	Do inglês <i>Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Disease</i>
TAMMV	Tempo de elevação da velocidade média
TEK	Tirosina quinase
TGFBR3	Receptor do fator de transformação do crescimento beta III
TLRs	Receptores toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
TwITCH	<i>Transcranial Doppler with Transfusion Changing to Hydroxyurea</i>
VCAM-1	Molécula de adesão celular-vascular-1
VCM	Volume corpuscular médio
VMM	Velocidade média máxima

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	HEMOGLOBINAS HUMANAS.	17
2.2	HEMOGLOBINOPATIAS.	20
2.3	ANEMIA FALCIFORME.	20
2.3.1	Histórico e definição	20
2.3.2	Epidemiologia.	22
2.3.3	Fisiopatologia.	24
2.3.4	Manifestações clínicas	26
2.3.5	Fenótipos da anemia falciforme	27
2.3.5.1	Hemoglobina fetal	29
2.3.5.2	Haplótipos do gene da β^S globina	30
2.3.5.3	Alfa talassemia.	31
2.4	DOENÇA CEREBROVASCULAR NA ANEMIA FALCIFORME	32
2.4.1	Definição, epidemiologia e fatores de risco	32
2.4.2	Acidente vascular cerebral Isquêmico (AVCI)	35
2.4.2.1	Fisiopatologia	36
2.4.2.2	Tratamento da prevenção secundária do AVCI.	39
2.4.2.2.1	<i>Regime de transfusão crônico</i>	39
2.4.2.2.2	<i>Transplante de células tronco hematopoiéticas</i>	41
2.4.2.3	Tratamento de prevenção primária do AVCI	41
2.4.2.3.1	<i>Doppler transcraniano.</i>	41
2.4.2.3.2	<i>Hidroxiuréia</i>	44
2.4.2.3.3	<i>Novas terapias</i>	45
2.4.2.4	Moduladores genéticos do AVCI	46
2.4.2.4.1	<i>Polimorfismo rs11853426 de gene ANXA2.</i>	48

2.4.2.4.2	Polimorfismo rs2238432 do gene ADCY9.	50
2.4.2.4.3	Polimorfismo rs489347 do gene TEK.	50
2.4.2.4.4	Polimorfismo rs284875 do gene TGFBR3.	53
2.4.2.4.5	Polimorfismo rs1044498 do gene ENPP1.	54
3.	OBJETIVOS	57
3.1	OBJETIVO GERAL	57
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
4.	MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	58
4.2	DESENHO DO ESTUDO E CASUÍSTICA	58
4.3	DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS	59
4.4	ANÁLISES MOLECULARES	59
4.4.1	Genotipagem de polimorfismos por PCR em tempo real	59
4.4.2	Genotipagem para o polimorfismo ANXA2 rs11853426.	61
4.4.3	Determinação da mutação $\alpha^{-3,7kb}$	62
4.4.4	Determinação dos haplótipos β^S globina	63
4.5	ANÁLISE DE DADOS	66
5.	RESULTADOS	67
5.1	CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS	67
5.2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E RESULTADOS DO DTC	67
5.3	GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS	69
5.4	GENOTIPAGEM DA ALFA TALASSEMIA E DE HAPLÓTIPOS β^S GLOBINA	70
5.5	COMPARAÇÃO DOS DADOS DO GRUPO CASO E GRUPO CONTROLE	71
6.	DISCUSSÃO	74
7.	CONCLUSÕES	80
8.	REFERÊNCIAS	81

9.	ANEXO	117
10.	CURRICULO LATTES	119

1. INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma das doenças genéticas mais comuns no mundo e é caracterizada pela herança da hemoglobina S (HbS), decorrente de uma mutação em homozigose no gene que codifica a cadeia globínica β (*HBB*; β^S GAG→GTG; glu6val). A base da fisiopatologia da doença é decorrente da polimerização da HbS sob baixas concentrações de oxigênio, levando a alterações físico-químicas na hemácia e deformações em seu citoesqueleto. A presença dos eritrócitos falcizados contribui para a ocorrência de eventos fisiopatológicos como a hemólise e a vasclusão na microcirculação, levando ao desenvolvimento de complicações clínicas, com destaque para as complicações cerebrovasculares. O acidente vascular cerebral (AVC) é uma das principais complicações da doença, atingindo crianças e adultos e é definido como um evento neurológico agudo secundário à oclusão de uma grande artéria cerebral ou à hemorragia, com posterior isquemia. Disfunção neurológica motora e cognitiva são as principais consequências, impactando de forma importante a vida do paciente. O AVC do tipo isquêmico (AVCI) é o mais comum nos pacientes com AF nas duas primeiras décadas de vida e as crianças apresentam um risco 300x maior de desenvolver a complicação, do que aquelas com perfil de hemoglobina normal, tornando assim a AF a maior causa de AVC durante a infância.

Atualmente a única metodologia disponível para identificação do risco de AVC na AF é o Doppler Transcraniano (DTC), que consiste em exame de ultrassonografia não invasivo e indolor, que estima a velocidade média das grandes artérias intracranianas do polígono de Willis, realizado em pacientes de 2 a 16 anos de idade. Os indivíduos são classificados de acordo com as velocidades obtidas em: normal (velocidade até 170cm/s); condicionante (entre 170cm/s e 199cm/s) e alto risco (AR) (maior ou igual a 200cm/s), de acordo com o estudo Stroke Prevention in Sickle Cell Disease (STOP), que avaliou o risco do desenvolvimento de AVCI detectado através do DTC. O estudo mostrou que o regime de transfusão crônico (RTC), terapia já utilizada na prevenção da recorrência do AVCI na AF, reduz o risco do AVCI primário em 92% em crianças que têm DTC AR. O DTC é a única ferramenta que auxilia na prevenção do AVCI primário, mas apresenta

algumas limitações. Alguns pacientes apresentam janela acústica espessa, impossibilitando a realização do exame. Além disso, é uma técnica de especificidade relativamente baixa, uma vez que cerca de 60% dos indivíduos classificados como AR não desenvolverão o AVC, sendo submetidos desnecessariamente ao RTC. Por outro lado, algumas crianças com DTC normal podem apresentar o AVC. Por fim, nem todos os centros oferecem o exame, assim como nem todos os pacientes o fazem com a regularidade necessária.

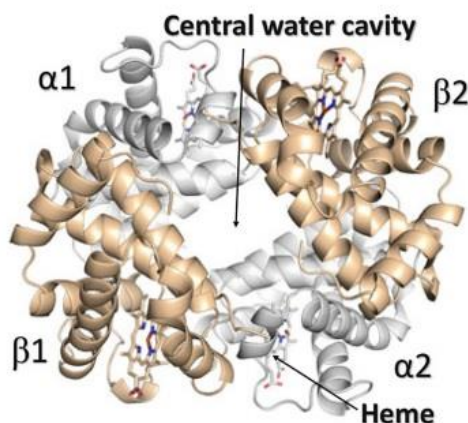
Diante dessas limitações, percebe-se a importância da identificação de novos moduladores que indiquem o risco do desenvolvimento de AVCI nos pacientes com AF, para que sejam utilizados como ferramenta de suporte aos resultados do DTC. Diversos estudos apontam que genes envolvidos em vias de inflamação, biologia do óxido nítrico, estresse oxidativo e adesão endotelial podem estar relacionados com desenvolvimento de doença cerebrovascular na AF. Polimorfismos nos genes *ANXA2*, *TEK*, *TGFB3*, *ADCY9*, *ENPP1*, a presença da coherança da talassemia alfa e haplótipos da β^S globina já foram relacionados com complicações cerebrovasculares na AF.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HEMOGLOBINAS HUMANAS

A hemoglobina (Hb) é a proteína responsável pelo transporte de oxigênio (O_2) através da circulação do sangue. Sua estrutura é formada por quatro subunidades. Cada uma delas é formada por uma porção protéica (globina) e um grupo prostético (heme). Existem diferentes tipos de globinas, todas formadas por duas globinas alfa e duas globinas não alfa. A HbA é uma proteína tetramérica composta por 2 pares de cadeias de polipeptídeos de globina: um par de cadeias de alfa (α) globina e um par de cadeias de beta (β) globina (Ahmed MH et al. 2020). Cada subunidade é ligada ao heme, uma molécula de protoporfirina ligada ao ferro na forma ferrosa (Fe^{2+}). O ferro, que tem a função de se ligar à molécula de oxigênio, quando oxidado, passa ao estado férrico (Fe^{3+}), cuja proteína passa a chamar-se metemoglobina (Ahmed MH et al. 2020). A figura 1 mostra a estrutura da hemoglobina.

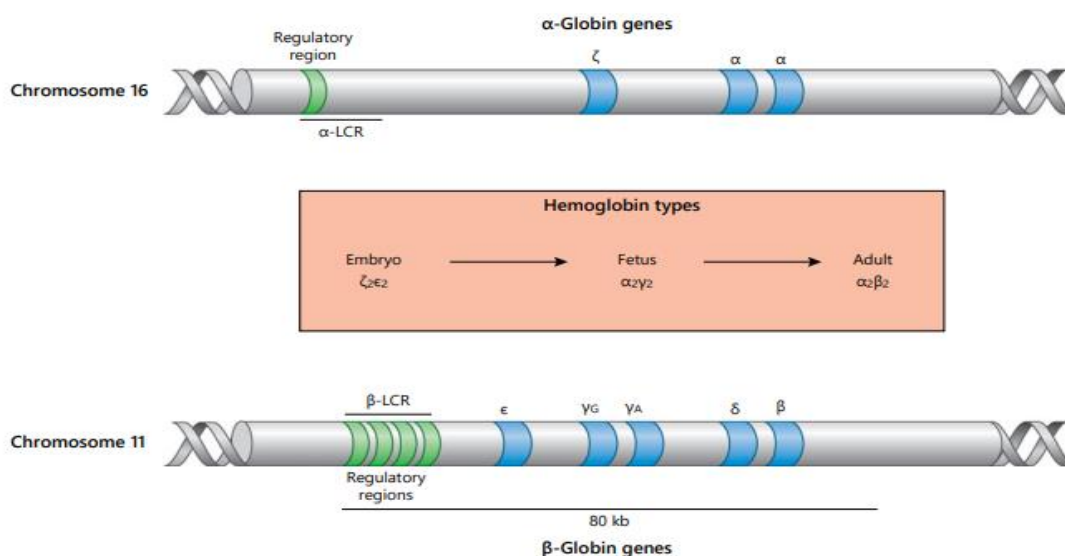
Figura 1– Estrutura da hemoglobina. Estrutura quaternária da hemoglobina com duas cadeias α e duas cadeias β coloridas em cinza e castanho, respectivamente.



Fonte: Ahmed MH (2020) Subcell Biochem.

Os genes da α globina são dois (*HBA1*, *HBA2*) e estão localizados no cromossoma 16 (16p13.3) juntamente com o gene embrionário zeta (ζ) (*HBZ1*). Não há nenhum substituto da alfa globina na formação de qualquer Hb normal existente desde o nascimento (Adekile A, 2021). O único gene da β globina (*HBB*) está localizado no cromossoma 11 (11p15.5) em um *cluster* de genes que contém um gene épsilon (ϵ) (*HBE1*), semelhante ao β embrionário, os genes da globina gama (γ) (*HBG1*, *HBG2*), e o gene da delta (δ) globina (*HBD*), como ilustrado pela figura 2.

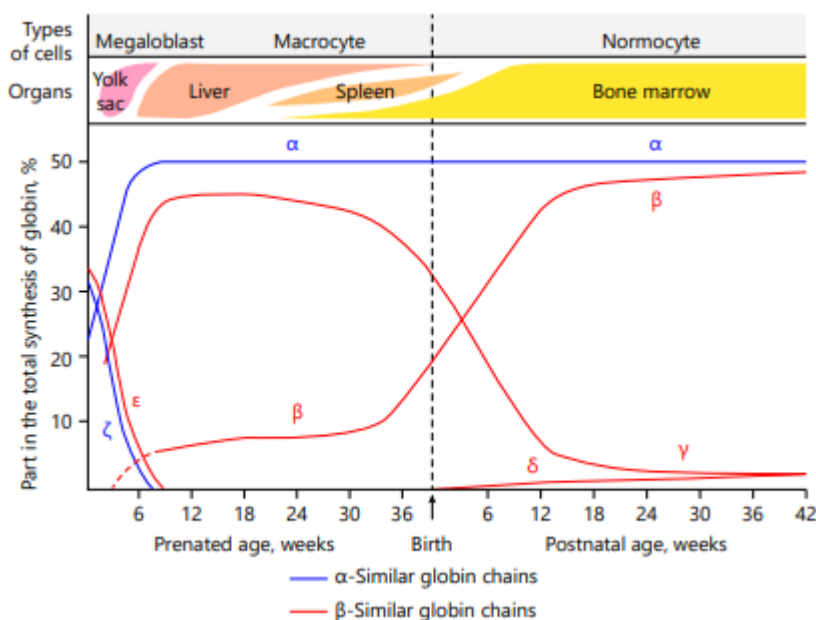
Figura 2- Estrutura dos genes da α e β globinas. Os genes da alfa e beta globinas localizam-se nos cromossomos 11 e 16, respectivamente.



Fonte: Med Princ Pract 2021;30:201-211.

No período embrionário, as hemoglobinas, que contêm as cadeias de globina ζ (*HBZ*) ou ϵ (*HBE1*) são detectáveis somente durante os estágios mais precoces da embriogênese (Shibayama N. 2020). Entre 4 a 14 semanas de gestação são sintetizadas 3 diferentes hemoglobinas: Hb GowerI ($\zeta 2/\epsilon 2$), Hb Portland ($\zeta 2/\gamma 2$) e GowerII ($\alpha 2/\epsilon 2$) (Hardson RC. 2012) em ordem de formação (Shibayama N. 2020). A partir da 14^a semana de gestação, após a eritropoiese fetal se estabelecer no fígado e no baço, estas hemoglobinas são substituídas pela hemoglobina fetal (HbF) ($\alpha 2/\gamma 2$), que permanece até o final da gestação (Adekile A, 2021). A HbF é a principal hemoglobina existente nas hemácias fetais durante a gestação, constituindo 60-80% do total da Hb até o nascimento, quando há a supressão da expressão do gene γ e expressão do gene da beta globina, após o nascimento, resultando na diminuição da HbF para níveis menores do que 0,5% e aumento da síntese de HbA ($\alpha 2/\beta 2$) para aproximadamente 97-98%, quando a substituição se completa em torno dos 6 meses de vida, como mostra a figura 2 (Shibayama N. 2020).

Figura 3– Ontogenia das hemoglobinas humanas. Mudança de hemoglobina da vida embrionária para a vida adulta.



Fonte: Wood WG (1976) Ir Med Bull 1976.

2.2 HEMOGLOBINOPATIAS

As hemoglobinopatias são doenças de origem genética, autossômicas recessivas, cujas mutações ocorrem no gene da β globina, que codifica a HbA. Estas alterações podem ser divididas em estruturais ou de produção. As hemoglobinopatias mais comuns são a talassemia e a doença falciforme. (Goonasekera HW et al. 2018).

A talassemia decorre do desequilíbrio das concentrações de α e β globinas, afetadas durante seu processo de síntese, levando à diminuição ou supressão destas. (Goonasekera HW et al. 2018). A doença falciforme (DF) é o tipo de hemoglobinopatia mais comum no mundo, causada pela mutação no gene da β globina, que produz uma proteína anormal, a hemoglobina S (HbS). A forma mais grave e mais comum deste tipo de hemoglobinopatia é denominada de Anemia falciforme (AF), forma homozigota (SS), decorrente da combinação de dois alelos mutantes β^S (HbSS). (Stuart et al. 2004; Serjeant, 2013). Quando há a coexistência da HbS com outras variantes anormais da β -globina, com as quais a HbS pode polimerizar também (ex: S β -talassemia, SC, SD etc), são denominadas de doença falciforme (DF) (Saraf et al. 2014).

2.3 ANEMIA FALCIFORME

2.3.1 Histórico e definição

A descoberta da hemoglobina S por Linus Pauling e colegas, feita em 1949, foi a primeira demonstração da produção de uma proteína anormal que poderia causar uma doença genética a partir do conceito de uma base molecular (Eaton WA. 2003; Mohanty D. 2014; Eaton WA. 2020). Jessé Accioly, médico alagoano, em 1946, quando cursava o 5º ano de Medicina na Faculdade de Medicina da Bahia, publicou nos Arquivos da Faculdade de Medicina da Bahia, o mecanismo da herança da anemia falciforme, jornal de circulação local (Accioly J. 1947). A sociedade científica internacional só tomou conhecimento do seu feito quando publicado, através da Profa. Eliane Azevêdo em divulgação internacional em 1973 (Azevêdo ES. 1973). No entanto J. V. Neel, um cientista independente já havia desenvolvido a mesma hipótese e publicado internacionalmente em 1947 (Neel JV. 1947). Em 1956, Vernon Ingram identificou a alteração na sequência de

aminoácidos da cadeia da beta globina (HBB; β S GAG→GTG; glu6val) (Ingram VM. 1956). Desde então muito conhecimento foi adquirido, mais intensificados a partir de meados de 1970, com o advento da tecnologia aplicada no campo da genética (Ahmed MH et al. 2020).

A substituição de uma base nitrogenada, a adenina pela timina, na posição do sexto códon do gene que codifica a β globina da Hb (HBB:c.20A>T, p.E6V), causa a troca do aminoácido ácido glutâmico pela valina, produzindo uma Hb anormal, a HbS, e resultando em alterações nas propriedades físico-químicas da molécula de Hb. (Kato GJ et al. 2018; Carden MA and Jane Little J. 2019) como ilustrado na figura 4.

Figure 4– Mutação genética do gene *HBB* na anemia falciforme. A hemoglobina normal é formada por duas subunidades α -globina e duas subunidades β -globina, a última é codificada pelo *HBB*. O alelo β^s da HbS é um alelo do gene *HBB* no qual há uma substituição da adenina pela timina, resultando na troca do ácido glutâmico pela valina na posição 6 na cadeia da β -globina. A HbS desoxigenada pode polimerizar e estes polímeros tornam a hemácia deformada.

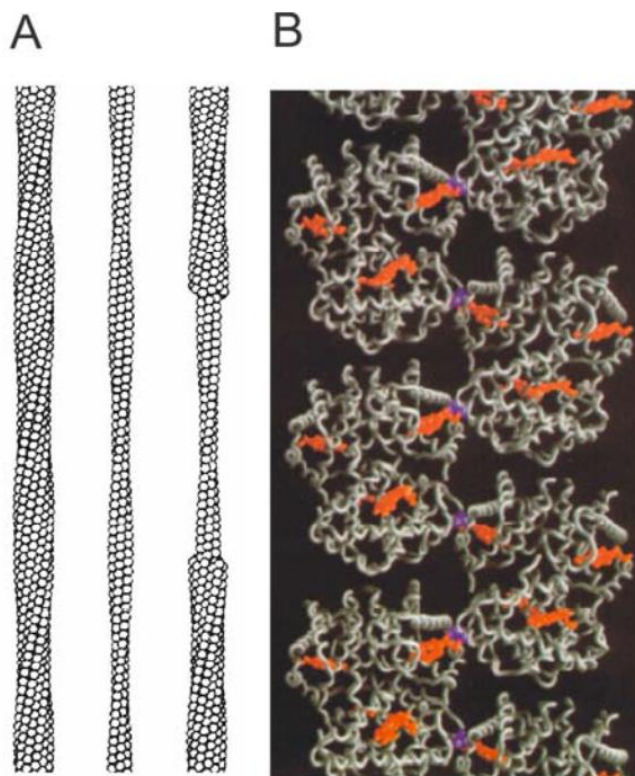
Cromossomo 11 – Sexto códon do gene da β globina



Fonte: Kato GJ et al. 2018 (modificado).

Em condições de desoxigenação, hipóxia e acidose, a molécula de HbS forma polímeros dentro da hemácia (Hc), que modificam seu citoesqueleto, causando alterações físico-químicas e tornando a hemácia densa e menos deformável, dando origem ao formato de foice ou meia-lua, patognomônico e indispensável para a patogênese da doença (Steinberg MH. 2022). Estas alterações desencadeiam uma cascata de eventos intra e extracelulares, incluindo rigidez e fragilidade da Hc, desidratação celular, ativação de receptores de adesão, oclusão da microvasculatura e ativação plaquetária, de neutrófilos e monócitos, culminando na formação de um estado pró inflamatório e pró trombótico. (Kaul et al. 1999; Steinberg. 1999; Stuart et al. 2004; Kato GJ et al. 2018; Piccin A et al. 2019). A figura 5 ilustra a estrutura dos polímeros da HbS.

Figura 5– Polímeros da HbS. (A) Estrutura dos polímeros visualizada por microscopia eletrônica. Cada esfera representa um tetrâmero da HbS. (B) Estrutura atômica da HbS desoxigenada visualizada através de cristalografia por raio X.



Fonte: Dykes GW (1978); Wishmer BC (1975).

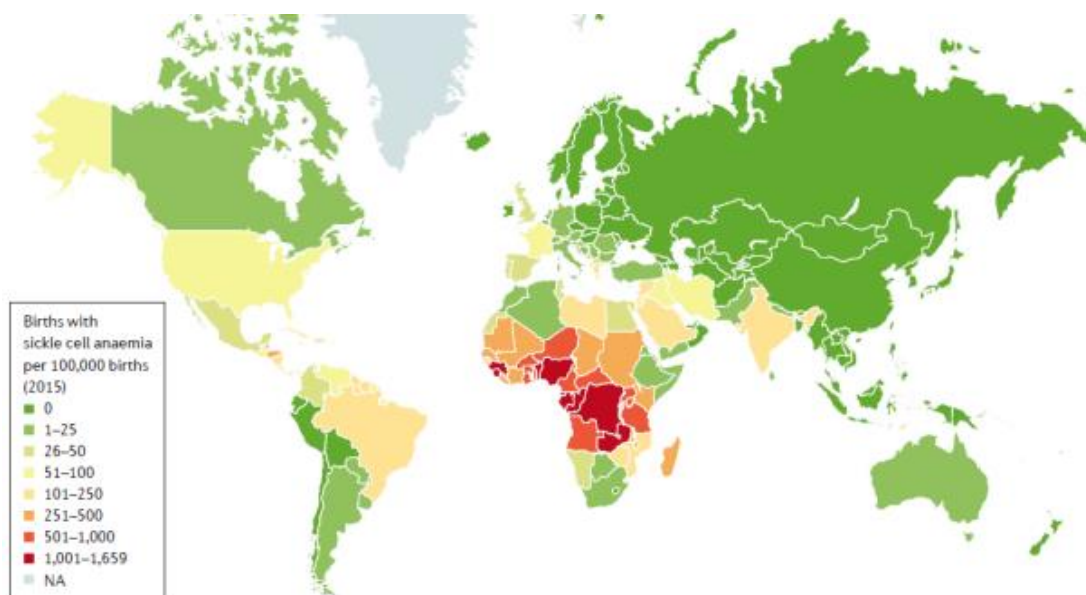
2.3.2 Epidemiologia

A anemia falciforme é a doença monogênica mais prevalente na África subsaariana, sul da Ásia, Oriente Médio e na região do Mediterrâneo. A cada ano, aproximadamente 300.000 recém-nascidos nascem com a AF no mundo e este número pode aumentar para 400.000 até o ano de 2050. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 20 a 25 milhões de indivíduos são portadores de AF no mundo, destes, 12-15 milhões estão na África subsaariana, 5 a 10 milhões na Índia e 3 milhões distribuídos pelo planeta. (Brousseau et al. 2010; Hassell. 2010; Piel FB et al. 2013; Piel FB et al. 2020; Bhattacharya et al. 2021 Sedrak et al. 2021).

A AF apresenta alto índice de mortalidade infantil, porém, apesar disso, atingiu ampla distribuição mundial através da migração e da pressão seletiva exercida em regiões que são endêmicas para malária, levando a doença ao status

de problema de saúde pública (Piel et al. 2010; Weatherall. 2010; Grosse et al. 2011). O portador do traço recessivo da AF, aquele que herda apenas um gene *HBSS* de um dos pais, é assintomático e, por consequência, na grande maioria das vezes, desconhece sua condição genética e a possibilidade de transmiti-la aos seus descendentes. A figura 6 representa o número estimado de recém-nascidos portadores de anemia falciforme nascidos no mundo.

Figura 6- Estimativa mundial de recém nascidos com anemia falciforme a cada 100.000 nascimentos por país em 2015.

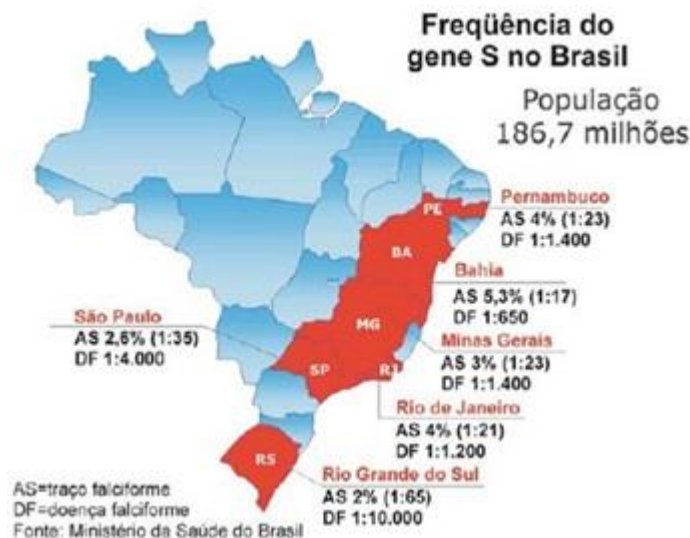


Fonte: Kato et al., 2018.

No Brasil, de acordo com os dados do Ministério da Saúde (2021), estima-se a prevalência de 25.000 a 30.000 portadores de AF e a incidência de 3.500 casos novos a cada ano. Estima-se também que 200.000 pessoas com o traço falciforme nascem ao ano, com o total de 8.000.000 de indivíduos, isso é, 4% da população brasileira. As maiores prevalências estão nas regiões norte, nordeste e sudeste. No estado de Pernambuco, estima-se que a incidência da doença seja de 1:700 nascidos vivos por ano. <

A figura 7 destaca a frequência do gene *HBSS* nas diferentes regiões do Brasil.

Figura 7- Frequência do gene S no Brasil.



Fonte: Ministério da Saúde, 2013. Cançado, R D (2007) Rev. Bras. Hematol. Hemoter.

2.3.3 Fisiopatologia

Dois principais fenômenos são característicos e responsáveis pela patogenia da AF: a vasclusão e a hemólise. Os polímeros da HbS distorcem o formato da hemácia, tornando-a densa, rígida e aderente. São formados agregados celulares de hemácias falcizadas, neutrófilos e monócitos ativados e plaquetas ativadas, provocando aumento do tempo de trânsito vascular, oclusão vascular e consequente indução da desoxigenação da Hb e mais polimerização. Além disso, a afinidade do O_2 com a HbS é menor do que a afinidade com a HbA, o que exacerba a polimerização (Kato GJ et al. 2018). A propagação da vasclusão culmina em inflamação, estado de hipercoagulabilidade e isquemia dos tecidos (Allali S et al. 2020).

Os polímeros da HbS distorcem o formato da hemácia, tornando-a densa, rígida e aderente. São formados agregados celulares de hemácias falcizadas, neutrófilos e monócitos ativados e plaquetas ativadas. Esta ativação das células imunes inatas liberam uma grande quantidade de citocinas e quimiocinas pró inflamatórias, que por sua vez aumentam a expressão das moléculas de adesão (Allali S et al. 2020). A P-selectina é uma molécula de adesão que facilita a

aderência de plaquetas e leucócitos ao endotélio, armazenadas no corpo de Weibel-Palade, no endotélio e no interior das plaquetas. Durante o processo inflamatório e de hipóxia, a P-selectina é liberada para a superfície do endotélio vascular, promovendo a aderência das células ao endotélio. O resultado é o aumento do tempo de trânsito vascular e consequente indução da desoxigenação da Hb e mais polimerização. Além disso, a afinidade do O² com a HbS é menor do que a afinidade com HbA, o que exacerba a polimerização (Kato GJ et al. 2018). A propagação da vasocclusão culmina em inflamação, estado de hipercoagulabilidade e isquemia dos tecidos (Allali S, et al. 2020).

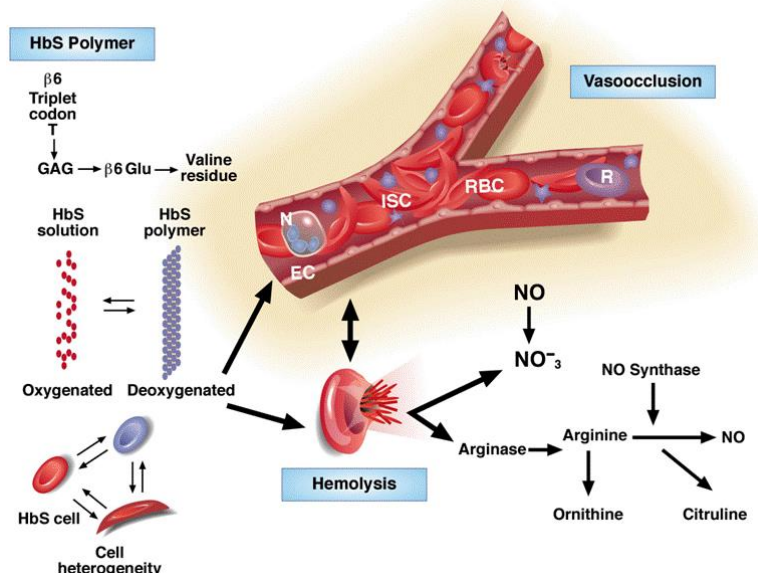
Em consequência da concentração aumentada dos polímeros da HbS que se acumulam na Hc (Rees et al. 2018), lesões celulares como dano à membrana da Hc, aumento de sua rigidez, desidratação e aumento da expressão de moléculas de adesão, levam à hemólise intravascular, com diminuição da meia vida das hemácias de 120 dias para 17 dias, em média. (Malowany et al. 2012). A hemólise ocorre numa taxa muito maior do que o normal, sem que o organismo possa resolver de forma adequada, causando anemia hemolítica crônica (Malowany et al. 2012).

Uma única Hc contém pelo menos 250 milhões de moléculas de Hb que, após a lise, estarão sob a forma livre na circulação sanguínea (Blackburn et al. 2018). A Hb livre é dividida em heme, ferro e globina. Estas estruturas catalisam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) que depletam o óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) através da produção de nitrato inerte (Kato et al. 2007; Kato et al. 2009; Schaer et al. 2013; Lindermayr et al. 2015). O NO é um radical livre produzido enzimaticamente pela família das NO sintetases (NOs) durante a conversão da arginina em citrulina. O NO endotelial é difundido para músculo liso adjacente, causando relaxamento. (Lindermayr et al. 2015). Na AF o NO também é depletado durante a hemólise intravascular, quando a arginase é liberada das Hcs, destruindo a arginina, substrato do NOs (Morris et al. 2005). O prejuízo na biodisponibilidade do NO causa disfunção do endotélio (Kato et al. 2007).

O produtos da hemólise intravascular danificam o sistema vascular, uma vez que o conjunto de alterações decorrentes do estado pró inflamatório, da hipercoagulabilidade e da perda da integridade estrutural do endotélio levam à injúria tecidual e isquemia (Pierrot et al. 2015).

Na literatura, para melhor compreensão, os fenômenos de vasocclusão e hemólise são descritos separadamente, porém ocorrem de forma contígua. A Figura 8 representa estes dois fenômenos.

Figura 8– Fisiopatologia da anemia falciforme. A HbS sofre polimerização reversível quando desoxigenada. O polímero falciforme fere o eritrócito e eventualmente produz danos irreversíveis à membrana. Essas células têm uma vida útil reduzida (hemólise), algumas das quais ocorrem por via intravascular consumindo óxido nítrico (NO). As hemácias falciformes também levam à vasocclusão.



Fonte: Steinberg MH (2008) The Scien Word J.

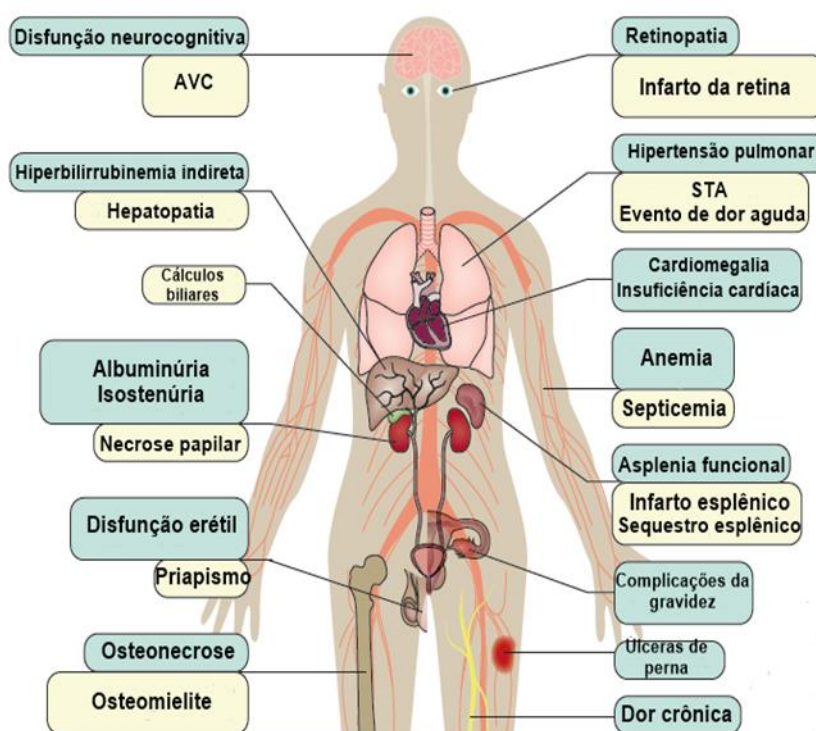
2.3.4 Manifestações clínicas

Indivíduos com a mesma mutação da doença podem apresentar evoluções diferentes em relação à gravidade e à mortalidade. (Steinberg et al. 1983; Platt et al. 1994; Serjeant et al. 2017). Fatores ambientais e genéticos provavelmente sejam a explicação para esta grande variabilidade do fenótipo da doença (Steinberg. 2009) . Fatores ambientais como condições socioeconômicas, grau de escolaridade, prevalência de doenças infectocontagiosas, além de acesso à assistência médica de qualidade, têm grande impacto na evolução da doença (Zago. 2007). Por outro lado, fatores genéticos já foram identificados como modificadores da AF. Os dois mais importantes são os determinantes do aumento do nível da HbF nas hemácias e a coexistência da alfa talassemia (α-Tal) que atuam diminuindo a polimerização da HbS (Steinberg. 2009; Rees et al. 2010, Steinberg MH. 2022. Runge A, et al. 2022).

Ao longo da vida, os pacientes com AF sofrem dos efeitos agudos e

cumulativos da falcização das hemácias, dos recorrentes episódios de vasclusão, isquemia e reperfusão, hemólise e inflamação (Serjeant. 2013), com consequentes efeitos multisistêmicos, uma vez que a doença tem sua origem no sangue (Kato et al, 2018). A figura 9 ilustra as principais complicações da doença (Meier et al. 2012, Kato et al, 2018) como a DCV, STA, priapismo, infecção, úlcera de perna.

Figura 9– Manifestações clínicas do anemia falciforme. Complicações agudas e crônicas da anemia falciforme. As complicações crônicas contribuem para a mortalidade precoce da doença.

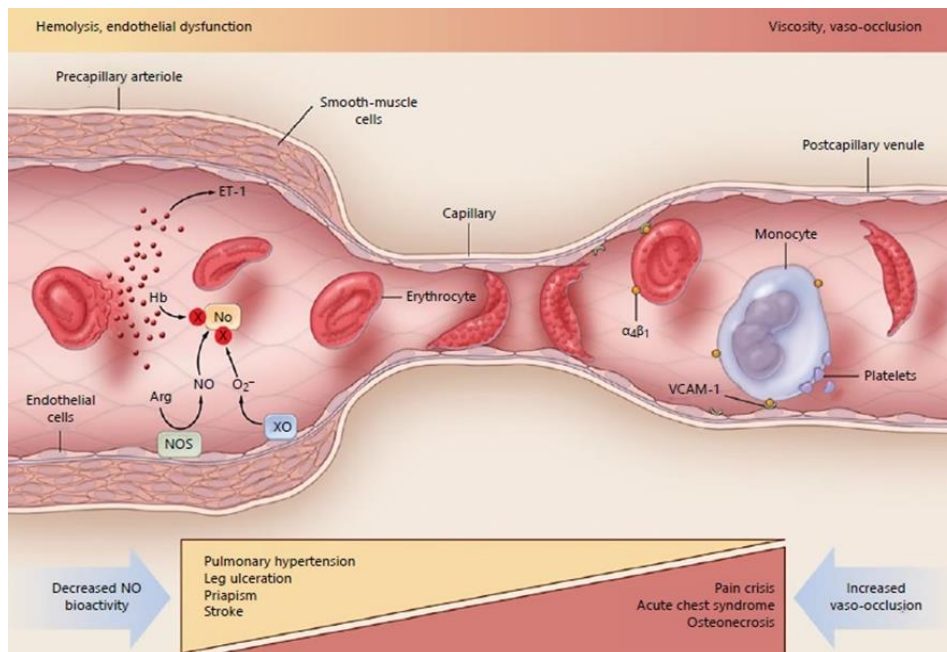


Fonte: Adaptado Kato et al, 2018.

2.3.5 Fenótipos da anemia falciforme

Atualmente são reconhecidos dois subfenótipos da doença, um relacionado à disfunção endotelial, secundária à hemólise e o outro relacionado à vasclusão e viscosidade, como ilustra a figura 10 (Kato et al. 2007).

Figura 10– Fenótipos da anemia falciforme. Os dois maiores fenótipos da Anemia Falciforme são a hemólise e a vasocclusão.



Fonte: Kato GJ (2007) Blood Rev.

Estes fenótipos, mesmo que reconhecidos separadamente, acontecem de forma simultânea, podendo haver sobreposição de um dos fenótipos ao outro em alguns pacientes (Kato et al. 2018; Adekile A. 2021).

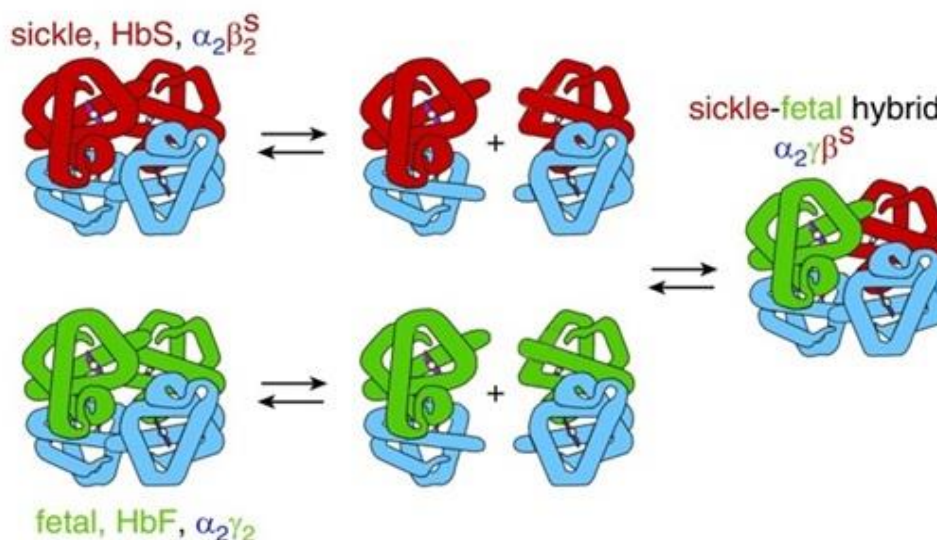
O espectro da disfunção endotelial está associado à hipertensão pulmonar, AVC, úlceras de perna e priapismo (Kato GJ et al. 2017, Kato et al. 2018), geralmente em pacientes que apresentam quadro de hemólise crônica mais intensa. O espectro da vasocclusão é associado à crises álgicas, STA e osteonecrose, em consequência do aumento da viscosidade, resultante do hematócrito (Ht) mais alto (Kato GJ et al. 2018). Os haplótipos da β^S globina, envolvidos com a modulação dos níveis de HbF ($\alpha_2\gamma_2$), e a coherança da α -Tal são moduladores genéticos com grande impacto nos fenótipos da AF (Steinberg MH. 2020; Vichinsky E, 2017; Mikobi et al. 2018).

2.3.5.1 Hemoglobina fetal

As primeiras manifestações clínicas da anemia falciforme iniciam-se em torno do sexto mês de vida, quando a síntese de cadeia da gama (γ) globina é substituída pela síntese de cadeias β , isto é, a HbF é substituída pela HbS (Ware et al. 2010; Blobel GA et al. 2015 Miller et al. 2000).

A extensão e duração da desoxigenação da Hb, a concentração intra-eritrocitária das hemoglobinas S e F estão diretamente relacionadas à polimerização da HbS (Rees et al. 2018). A HbF tem grande força anti-polimerização pois as subunidades de γ globina formam um heterotetrâmero híbrido em combinação com 2 cadeias de α -globinas, uma de γ -globina e uma de β -globina, que não sofrem polimerização, pois são muito mais solúveis que o homotetrâmero $\alpha_2\beta^S_2$ (Eaton and Bunn HF, 2017, Rees et al, 2018; Williams and Thein, 2018, Henry ER et al. 2020). A Figura 11 representa o mecanismo de inibição da polimerização realizado pela HbF.

Figura 11– Mecanismo de inibição da polimerização da HbS pela HbF. Dissociação dos tetrâmeros em dímeros e reassociação na composição da HbS com HbF, resultando em três tetrâmeros com consequente diminuição da fração do homotetrâmero HbS ($\alpha_2\beta^S_2$).



Fonte: Bunn HF, McDonough M, 1974.

A hemoglobina fetal ($\alpha_2\gamma_2$), tem grande significado clínico para a AF, uma vez que pacientes com maiores níveis de HbF, apresentam menos complicações da doença (Eaten WA and Bunn HF. 2017; Steinberg MH. 2020) evidenciando o

efeito protetor da HbF na AF (van der Land V et al. 2016; Eaton WA and Bunn HF. 2017). Um bom exemplo para isso é o caso da persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF). Deleções do gene da β -globina ou mutações pontuais nos promotores dos genes da HbF levam a níveis elevados de HbF (Menzel S and Thein SL. 2019). De forma geral, o fenótipo causado por essas mutações é denominado PHHF (Lettre G and Bauer DE. 2016). A pancelularidade da HbF associada a essas mutações inibe a polimerização da HbS na maioria das hemácias falciformes, de modo que esses pacientes geralmente apresentam redução importante da hemólise e das complicações vasclusivas (Steinberg MH. 2020b). Foi demonstrado que polimorfismos genéticos em três locus de características quantitativas (QTL): *Xmn1-HBG2*, *HMIP-2(MYB)* e *BCL11A*, que influenciam nos níveis de HbF e na gravidade da doença na AF. O gene *BCL11A* é um regulador repressor da expressão da HbF. Indivíduos portadores de polimorfismos no gene *BCL11A* são conhecidos por terem expressão diminuída de *BCL11A*, o que resulta em aumento da produção de HbF (Uda M et al. 2008; Friedrisch JR et al. 2018).

2.3.5.2 Haplótipos do gene da β^S globina

Os hapótipos do gene da β^S globina são sítios polimórficos localizados no *cluster* da β -globina. Diferentes haplótipos foram nomeados de acordo com sua origem étnica e geográfica. São eles: Benin (BEN), República Central Africana (CAR), Senegal (SEN), Camarões (CAM) e Árabe-Indiano (AI) (Lindenau et al. 2016; Serjeant and Vichinsky 2017; Adekile A. 2021). Os haplótipos da β^S globina estão envolvidos com a modulação dos níveis de HbF ($\alpha_2\gamma_2$), mediada por variantes polimórficas na região promotora do gene da γ globina (Quinn and Miller 2004; Menzel S and Thein SL. 2019).

Pacientes portadores de AF com haplótipo SEN e AI apresentam maiores níveis de Hb F (>15%), sendo associados à forma clínica menos grave da doença. Por outro lado pacientes que apresentam haplótipo CAR tendem a desenvolver um quadro clínico mais grave, pois cursam com níveis diminuídos de HbF (<5%). Pacientes que possuem o haplótipo BEN apresentam níveis intermediários de HbF (5 a 15%) e quadros clínicos moderados, no que diz respeito à gravidade da doença

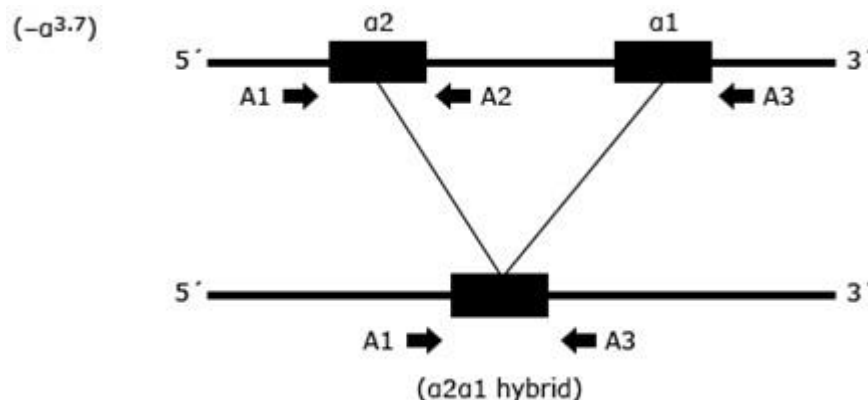
(Gravitz and Pincock 2014; Serjeant GR and Vichinsky E, 2017, Williams and Thein, 2018).

2.3.5.3 Alfa talassemia

As deleções dos genes da alfa globina causam um desequilíbrio da síntese entre as cadeias globínicas α e β (Steinberg and Adewoye. 2006), como é o caso da deleção – $\alpha^{3,7kb}$, representada pela figura 12. A existência da coherança da alfa talassemia com a AF levará a menor produção de cadeias da alfa globina, redução da concentração intracelular de Hb e, conseqüentemente, redução da polimerização, modulando outras características hematológicas como aumento no número de hemácias, dos níveis de Hb total e hematócrito, e diminuição dos níveis de volume corpuscular médio, Hb corpuscular média, concentração média de Hb corpuscular, reticulócitos, leucócitos e hemólise (Steinberg and Adewoye. 2006; Rumaney et al. 2014).

Por estes motivos a ocorrência da coherança da alfa talassemia com a AF tem efeito modulador de proteção contra complicações da doença relacionadas à intensidade da hemólise, como no priapismo (Nolan VG et al. 2005), úlceras de pernas (Senet P et al. 2017), acidente vascular cerebral, (Griffin PJ, et al. 2014; Rumaney et al. 2014; Tewaris et al. 2015; Joly P, et al, 2016; Mikobi et al. 2018; Hatzlhofer BLD et al. 2021), ao mesmo tempo que aumenta o risco de complicações mais diretamente relacionadas à maior viscosidade do sangue como as crises álgicas, síndrome torácica aguda e osteonecrose (Steinberg et al. 2012). A coherança da talassemia alfa também tem efeito protetor contra resultados anormais do doppler transcraniano (DTC) (Joly P, et al, 2016) em resultado ao efeito de redução da hemólise e da exposição da fosfatidilserina na superfície da membrana da Hc, conseqüentemente diminuindo a adesão celular ao endotélio e redução da injúria vascular (Griffin PJ, et al. 2014, Ojewunmi OO et al. 2021; Reggiani G et al. 2023).

Figura 12– Deleção – $\alpha^{3,7\text{kb}}$.



Fonte: Shimauti EL (2015) Genet Mol Biol.

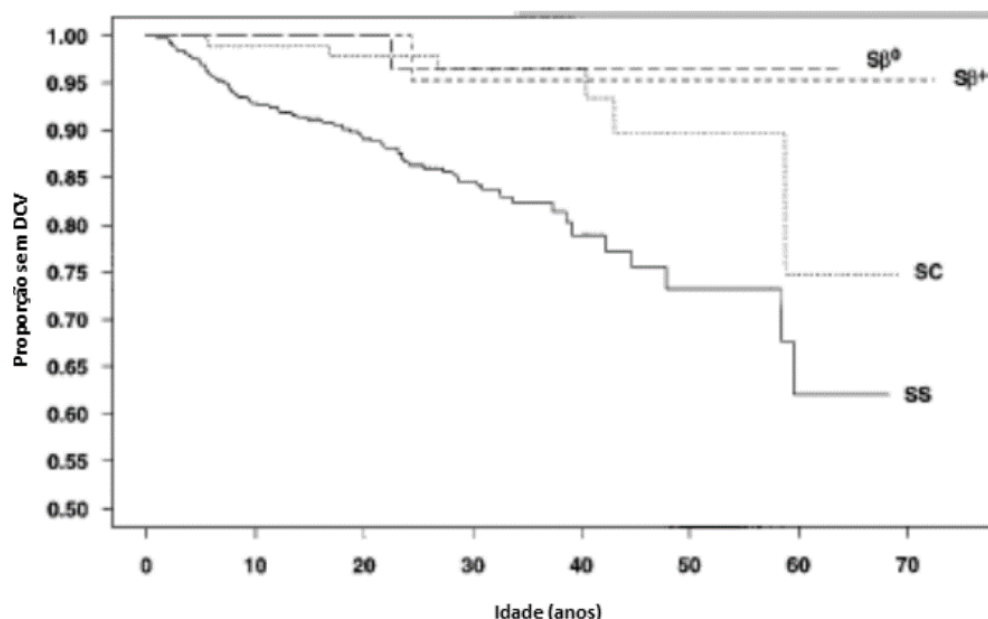
2.4 DOENÇA CEREBROVASCULAR NA ANEMIA FALCIFORME

2.4.1 Definição, epidemiologia e fatores de risco

A AF é a doença hematológica mais associada às doenças neurológicas que ocorrem na faixa etária pediátrica. Crianças com a AF apresentam 300 vezes mais chance de apresentar o AVC que crianças que não têm a doença (Broderick et al. 1993; Ohene-Frempong et al. 1998). É uma das complicações mais graves da doença, levando a altos índices de morbidade (Arnold SD et al. 2017).

A frequência da doença cerebrovascular tem relação com o genótipo da doença falciforme e população estudada. A maior incidência ocorre em homozigotos com SS (0,61/100 pacientes/ano), seguido dos indivíduos SC (0,15/100/ano), $S\beta^+$ -talassemia (0,09/100/ano), e $S\beta^0$ - talassemia (0,08/100/ano). A figura 13 retrata a idade do primeiro AVCI de acordo com o genótipo da DF (Ohene-Frempong et al. 1998).

Figura 13– Idade media do primeiro evento de doença cerebrovascular por genótipo da doença falciforme; (—) SS; (...) SC; (---) $S\beta^+$ -tal; (- -) $S\beta^0$ -tal.



Fonte: Ohene-Frempong K (1998) Blood Jan 1;91(1):288-94.

Na AF, a DCV abrange desde eventos estruturais a funcionais (Quinn. 2013), cujos principais são o acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) e hemorrágico (AVCH), ataque isquêmico transitório (AIT), infarto silencioso (IS) e síndrome moyamoya (DeBaun MR et al. 2020). AVCI é o evento neurológico agudo com duração de mais de 24 horas, secundário à oclusão de uma artéria, resultando em isquemia e déficit neurológico (Ohene-Frempong et al. 1998; DeBaun MR et al. 2020). Na AF o AVCI ocorre por estreitamento seguitar progressivo da porção distal da artéria carótida interna e ramos proximais das principais artérias intracranianas do polígono de Willis. O AVCH é o evento neurológico agudo com duração maior que 24 horas, secundário à hemorragia de uma artéria, resultando em isquemia e déficit neurológico (Ohene-Frempong et al. 1998, DeBaun MR et al. 2020). AIT é o evento neurológico cujos sintomas se resolvem em <24 horas, sem evidência radiológica (ou em 48 horas se o sistema basilar estiver envolvido) (Ohene-Frempong et al. 1998, DeBaun MR et al. 2020). IS é a evidência de pequeno infarto cerebral através da ressonância magnética de imagem (RNM) sem correlação clínica (Abboud et al. 2011, DeBaun MR et al. 2020). Estima-se que 25% das crianças com AF menores que 6 anos de idade já apresentam o IS (Hasson et al. 2019), mais que 33% até os 18 anos (DeBaun et al. 2012; Bernaudin et al. 2015), quase a metade dos pacientes até os 14 anos (Bernaudin et al. 2010) e 53% dos

adultos com idade em torno de 30 anos (Kassim et al. 2016). Crianças com IS têm maior risco de ter AVC e IS progressivo (Miller et al. 2001; Pegelow et al. 2002, DeBaun MR et al. 2020) e as morbidades associadas são redução da habilidade intelectual e do progresso escolar (Schatz et al. 2001, DeBaun MR et al. 2020).

O estreitamento segmentar progressivo do diâmetro intraluminal das artérias cerebrais internas e artérias cerebrais médias (ACM) reduz o fluxo sanguíneo dos hemisférios cerebrais, com consequente vasodilatação dos vasos da cortical, recrutando mecanismos de compensação através de neovascularização colateral, visualizadas através RNM cerebral ou angiorressonância (ARM) cerebral, denominada síndrome de moyamoya, que geralmente situa-se na base do cérebro e menos frequentemente nos troncos proximais das artérias cerebrais posteriores (Russell et al. 1984; Smith et al. 2012; Rallo MS et al. 2022). A síndrome de moyamoya representa uma das formas mais severas de arteriopatia e representa grande risco de complicações trombóticas (Helton et al. 2014; Fasano et al. 2015).

Algumas características laboratoriais estão bem estabelecidas como fatores de risco para o desenvolvimento de acidente vascular cerebral, como nível mais baixo de hemoglobina (Hokazono M et al. 2011; Meier ER et al. 2016; Rankine-Mullings AE et al. 2018; Rankine-Mullings A et al. 2021; Ataga KI et al. 2020; Reggiani G et al. 2023), e aumento da hemólise medida através da contagem dos reticulócitos e lactato desidrogenase (Rees DC et al. 2008; Bernaudin F et al. 2011; Coic L et al. 2011; Silva CM et al. 2011; Meyer ER et al. 2014; Belisário AR et al. 2016; Bernaudin F, et al. 2016; Ware RE et al. 2016), níveis de aspartato aminotransferase (Miller ST et al. 2001) e leucocitose (Hyacinth HI et al. 2012). A leucocitose é uma das características laboratoriais comuns na AF. Algumas das explicações para isso são hipoesplenismo ou asplenia e a estimulação da medula óssea pela hemólise crônica (Stewart WM et al. 1992) e está associada a maior risco de AVC (Miller ST et al. 2000) e à síndrome torácica aguda (STA) (Platt OS. 2000, Klings ES and Steinberg MH. 2022).

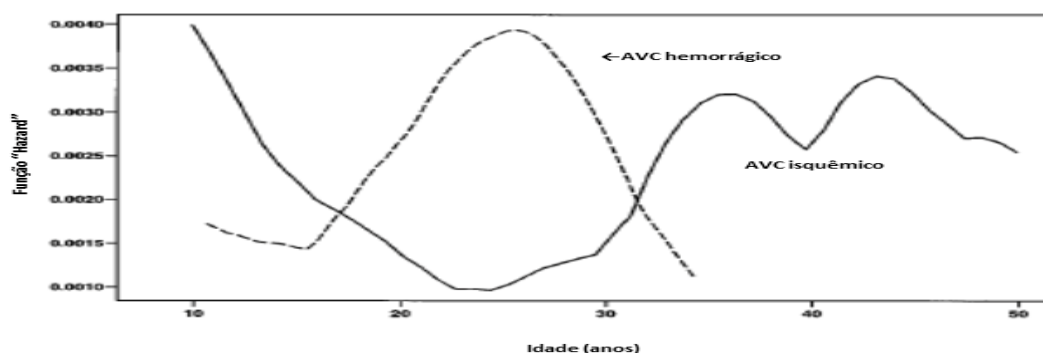
A síndrome torácica aguda (STA) é um evento clínico que apresenta associação com a ocorrência da DCV (Belisário et al. 2016; Klings ES and Steinberg MH. 2022, Koehl JL et al. 2022). É uma das mais graves complicações da AF, segunda maior causa de internação hospitalar e também apresenta alto índice de mortalidade (Meier et al. 2012; Koehl JL. 2022). É mais frequente no

portador da AF, forma homozigota (SS) e três vezes mais comum em crianças, mas mais grave em adultos (Klings ES and Steinberg MH. 2022). É caracterizada por aparecimento de novo infiltrado pulmonar, febre e sintomas respiratórios, cuja etiologia pode ser infecciosa, infarto pulmonar ou embolia gordurosa (Vichinsky EP, et al. 1997; Ballas SK. 2018). O comprometimento pulmonar e insuficiência respiratória levam à hipóxia, fator importante no desencadeamento da polimerização das hemácias falciformes (Koehl JL et al. 2022). Eventos neurológicos estão associados à complicação da STA, principalmente quando a doença pulmonar é grave e quando ocorre falência respiratória. Oximetria de pulso $<96\%$ está associada ao aumento do risco de eventos neurológicos como AVC, infartos cerebrais silenciosos, síndrome de leucoencefalomalácia posterior reversível, encefalite necrotizante aguda e de crise álgica (Rackoff WR et al. 1993; Henderson JN et al. 2003).

2.4.2 Acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI)

Até os 20 anos de idade estima-se que 11% dos portadores de AF terão AVC e 20% até os 40 anos (Ohene-Frempong et al. 1998; Bernaudin et al. 2010, DeBaun MR et al. 2020). O AVCI acontece predominantemente no período da infância e adolescência e o AVCH na fase adulta (Powars et al. 1978; Adams et al. 1994; Ohene-Frempong et al. 1998; Van et al. 2014; Koehl JL et al. 2022) como retratado na figura 14.

Figura 14– Incidência por idade do risco de acidente vascular cerebral isquêmico e hemorrágico em pacientes com anemia falciforme. Linha contínua: AVC isquêmico; Linha tracejada: AVC hemorrágico.



Fonte: Ohene-Frempong K (1998) Blood Jan 1;91(1):288-94

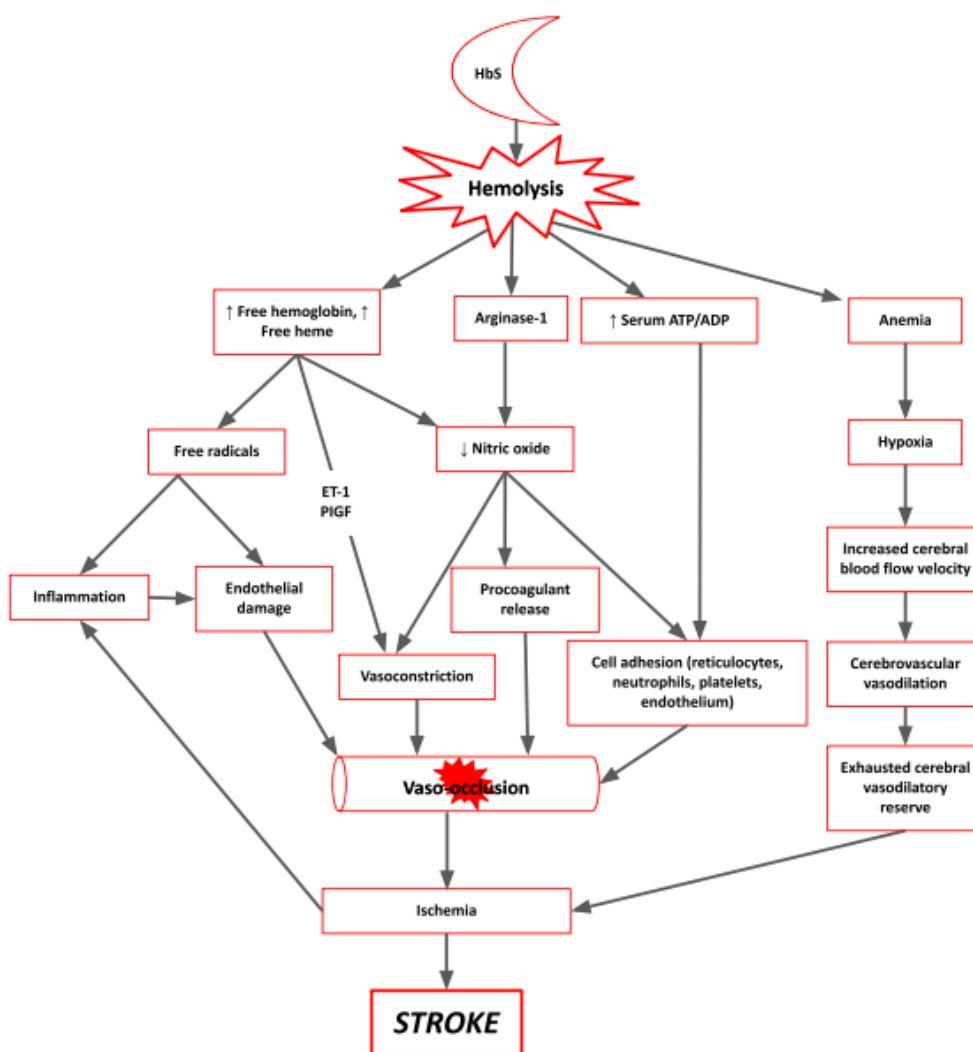
Afasia, prejuízo na fala, inabilidade motora (hemi ou quadriparesia) e prejuízo cognitivo permanente são sequelas comuns nos sobreviventes do AVCI (Connes et al. 2013). O óbito decorrente do AVCI é raro, diferentemente do óbito por AVCH que é de aproximadamente 25% (DeBaun MR et al. 2020).

O AVCI, assim como o IS podem ocorrer após a ocorrência de STA, (Colombatti et al. 2013; Rankine-Mullings et al. 2018), anemia aguda como consequência de sequestro esplênico e infecção pelo parvovirus B19 (Solomou et al. 2013; Nottage et al. 2016; Rigano et al. 2018), hipóxia noturna (Kirkham FJ et al. 2001), eventos nos quais quedas importantes de Hb ou hipóxia ocorrem (Ojewunmi et al. 2018; Colombatti R et al. 2018).

2.4.2.1 Fisiopatologia

A fisiopatologia do AVCI inicia-se com a falcização da hemácia, cujo processo ocorre de forma aguda e crônica, ativando uma sequência de eventos que culminam na vasoclusão, isquemia e por fim no AVCI (Sundd et al. 2019; Runge A et al. 2022). As evidências levam a crer que o AVCI seja uma consequência de vários fatores como reologia anormal da hemácia falcizada, hemólise, inflamação, estado de hipercoagulabilidade, hipóxia, anemia, disfunção endotelial e fatores genéticos que resultam na oclusão de grandes artérias cerebrais, como ilustrado na Figura 15 (Runge A et al. 2022).

Figura 15– Fisiopatologia do AVCI na AF: hemácias falciformes hemolisadas liberam hemoglobina livre, arginase-1 e ATP/ADP sérico. O aumento da Hb livre amplia a atividade da reação de Fenton, que aumenta a produção de radicais livres causado pelo heme livre e consumo do óxido nítrico (NO). A arginase-1 esgota ainda mais o NO ao consumir a L-arginina plasmática, que normalmente é convertida em NO através da síntese do óxido nítrico endotelial (eNOS). A depleção adicional de NO resulta em vasoconstrição, liberação de pró coagulantes e ativação de moléculas de adesão celular, que contribuem para a vasocclusão. Além disso, os radicais livres provocam danos endoteliais e vasocclusão. O heme livre aumenta a produção de endotelina-1 (ET-1) e fator de crescimento placentário (PIGF), exacerbando a vasoconstrição. A liberação de ATP/ADP promove ainda a ativação de moléculas de adesão celular e vasocclusão. A hemólise crônica leva à anemia e hipóxia cerebral, promovendo vasodilatação cerebrovascular que não é capaz de compensar adequadamente a hipóxia, resultando em AVCI.



Fonte: Runge A (2022) J Neurol Scien.

Durante a hemólise intravascular, a ruptura de hemácias libera na circulação sanguínea hemoglobina, nucleotídeos de adenina e arginase-1. A

hemoglobina livre é removida do sangue pela haptoglobina ou oxidada através do óxido nítrico (NO) em metemoglobina, que rapidamente é degradada em heme livre. Este é subsequentemente eliminado pela hemopexina, uma proteína com grande afinidade pelo heme, formando os complexos heme-hemopexina que são absorvidos por macrófagos e hepatócitos através de endocitose mediada por receptor (Santiago RP et al. 2018). Em situações de hemólise excessiva na anemia falciforme, a haptoglobina, a hemopexina e o NO estão esgotados, levando ao acúmulo de hemoglobina livre e heme livre na circulação. O heme livre aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em estresse oxidativo e inflamação (Kato GJ et al. 2017). O processo inflamatório leva ao aumento da expressão de moléculas de adesão celular. A P-selectina, que media a adesão entre as hemácias falciformes e o endotélio, bem como entre leucócitos, plaquetas e células endoteliais, é cronicamente ativada nas plaquetas e nas células endoteliais em pacientes com AF (Matsui NM et al. 2001). Os reticulócitos falciformes também têm expressão aumentada de moléculas de adesão (Belisário et al, 2016; Brousse V et al. 2015). A ativação das plaquetas desempenham um papel importante na vasoclusão através da ativação de neutrófilos e da indução de um estado inflamatório e de hipercoagulabilidade (Polanowska-Grabowska R et al. 2010).

A hemólise libera a arginase eritrocitária- 1, esgotando a arginase, substrato da síntese do NO, que leva à redução da biodisponibilidade de NO (C.D. Reiter CD et al. 2002; Morris CR et al. 2005). Níveis diminuídos de NO limitam a conversão de GTP (guanosina trifosfato) em cGMP (guanosina monofosfato cíclico), que é necessário para relaxar o músculo liso vascular e permitir a vasodilatação (Kato GJ et al. 2017). A interrupção deste processo leva, portanto, ao aumento da vasoconstrição, agravada pelo aumento da liberação de endotelina-1, um potente vasoconstritor endógeno das células endoteliais, quando expostas à hemoglobina livre (Ergul S et al. 2017).

A hemólise crônica na anemia falciforme resulta em anemia que, por sua vez, induz à hipóxia, causando polimerização da HbS e falcização, adesão eritrocitária e vasoclusão (Papageorgiou DP et al. 2018). A anemia também diminui o conteúdo de oxigênio arterial, levando à vasodilatação progressiva da vasculatura cerebral no intuito de manter o fornecimento adequado de oxigênio ao cérebro (Guilliams et al. (2019). A taxa de fluxo sanguíneo cerebral (FSC) é aumentada para

atender a demanda cerebral de oxigênio. Com o tempo, os vasos sanguíneos cerebrais demonstram reserva vascular reduzida e capacidade vasodilatadora diminuída, piorando a sua capacidade de regular adequadamente o FSC (Václavů L et al. 2019). Em casos de anemia grave, como durante as crises vasocclusivas, os vasos cerebrais atingem a vasodilatação máxima e não conseguem compensar a diminuição do conteúdo de oxigênio arterial, resultando em isquemia cerebral e aumento do risco de AVC (Kosinski PD et al. 2017; Fortin et al. 2018; Bhattacharya P et al. 2021). O FSC está inversamente associado à hemoglobina e correlacionado positivamente com a bilirrubina e a LDH na AF (Václavů L et al. 2019). Estudos de ressonância magnética cerebral demonstraram a diminuição da taxa metabólica cerebral de oxigênio no cérebro de indivíduos com AF (Václavů L et al. 2019; Vu C et al. 2021).

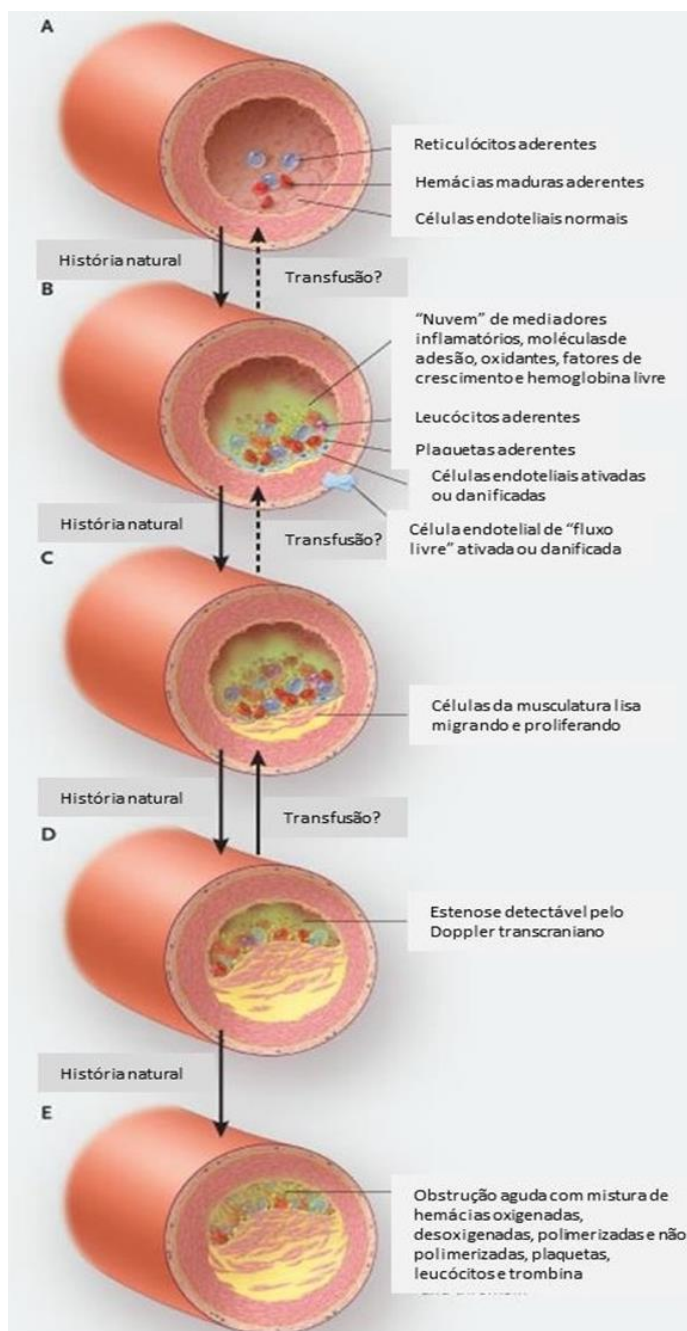
Episódios vasocclusivos recorrentes resultam em isquemia cíclica, necrose e lesão de reperfusão, causando disfunção endotelial e alterando a estrutura das grandes artérias cerebrais (Switzer JA et al. 2006) com consquente proliferação das células do músculo liso, hiperplasia da camada íntima e média por aumento de fibroblastos, degeneração da lâmina elástica, fibrose da adventícia (Inusa et al. 2014). A arteriopatia estenocclusiva (AEO) da porção distal das artérias caróticas internas (ACIs) e dos ramos proximais das principais artérias intracranianas do polígono de Willis é comumente a lesão final que causa o AVCI (Fasano et al. 2015).

2.4.2.2 Tratamento da prevenção secundária do AVCI

2.4.2.2.1 Regime de transfusão crônico

A explicação proposta por Platt (2005), representada pela Figura 16, é uma boa aproximação do que acontece nas grandes artérias cerebrais antes do AVCI (Platt. 2005). O diagrama mostra os fatores que iniciam e promovem a vasculopatia das grandes artérias cerebrais na AF. As setas sólidas representam a progressão e as setas tracejadas representam o efeito presumido do RTC, que poderá impedir ou reverter o processo se for iniciado antes de estenoses graves serem formadas (Platt. 2005). Um dos efeitos do RTC é a redução do nível de hemoglobina livre no plasma, mesmo efeito protetor imputado à coherança da α -Tal (De Montalembert et al. 2013; Webb et al. 2013).

Figura 16– Arteriopatia venoclusiva e efeitos do regime de transfusão crónica. Danos às artérias cerebrais resultam na ligação de reticulócitos e hemácias maduras nas células endoteliais através de ligantes específicos. Essas células são expostas a agentes oxidantes, fazendo com que elas sejam ativadas (Painel A). Células endoteliais ativadas tornam-se cada vez mais aderentes às hemácias, leucócitos e plaquetas. Algumas células endoteliais são desalojadas da matriz subjacente (Painel B). Quanto mais células aderem e são ativadas, mediadores inflamatórios, quimioatrativos, moléculas de adesão, fatores de crescimento, pró-coagulantes e hemoglobina livre são produzidos. Células do músculo liso migram e proliferam, causando uma lesão hiperplásica que invade a lúmen da artéria (Painel C). A lesão, embora assintomática, torna-se detectável ao doppler transcraniano (Painel D). O regime de transfusão crônica, mantendo o nível de Hb S abaixo da concentração de 30 a 40%, impede a falcização aguda e o acidente vascular cerebral (Painel E) e promove a reversão do dano. Quando o regime de transfusão é interrompido, a lesão pode desenvolver-se novamente.



Fonte: Platt OS (1994) N Engl J Med.

O RTC deverá ser realizada com hemácias fenotipadas e deleucocitadas, medidas necessária para prevenir a aloimunização e reações transfusionais respectivamente (DeBaun et al. 2020). Geralmente, após 12 meses do RTC iniciado, será necessário o uso de quelante do ferro com o objetivo de atenuar o depósito de ferro excessivo causado pelas transfusões de concentrados de hemácias (DeBaun et al. 2020). Apesar da realização do RTC, a recorrência do AVCI pode ocorrer em alguns casos, principalmente aqueles em que a AEO já existe (Hulbert et al. 2011; Arkuzewski et al. 2014, Estcourt et al. 2020).

2.4.2.2.2 Transplante de células tronco hematopoiéticas

Uma das indicações do transplante de células tronco hematopoiética na AF é a doença vascular cerebral (Bernaudin F. 2019). Este procedimento tem apresentado sobrevida livre de doença de 5 anos em torno de 92% e os melhores resultados são alcançados se realizado antes dos 12 anos de idade (Gluckman E et al. 2017). É um procedimento que necessita de um doador aparentado compatível, é de alto custo e associado a riscos (Arnold et al. 2017, Brandow AM and Liem RI, 2022).

2.4.2.3 Tratamento da prevenção primária do AVCI

2.4.2.3.1 Doppler transcraniano

A anemia falciforme é uma doença altamente heterogênea em sua apresentação clínica e por isso se faz necessário uma ferramenta que proporcione a identificação do paciente de alto risco para AVCI (Meier et al. 2012), possibilitando que condutas importantes sejam tomadas como a realização do regime de transfusão crônico (RTC), a introdução precoce da hidroxiuréia (HU) e até mesmo a realização do transplante de células tronco hematopoiéticas (De abun et al, 2020), no intuito da prevenção de prejuízos cognitivos e motores que acontecem com o acometimento do AVCI, minimizando assim a morbidade e letalidade da doença e os custos gerados pelo tratamento de suas complicações (De abun et al, 2020).

O DTC é a única ferramenta clínica validada para triagem do risco para

AVCI, como demonstrado pelo estudo americano STOP (Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Disease), marco importante no cuidado aos pacientes portadores de AF (Adams et al. 1992; Adams et al. 1997; Adams et al. 1998). Estudo clínico, controlado e randomizado, realizado em crianças com AF, avaliou o risco do desenvolvimento de AVCI detectado através do DTC. O estudo mostrou que o RTC, terapia já utilizada na prevenção da recorrência do AVCI na AF, reduz o risco do AVCI primário em 92% em crianças que têm DTC com velocidades aumentadas (DTC de alto risco – DTC AR) (Adams et al. 1998), além de reduzir a progressão da AEO (Adams et al. 1998; Abboud et al. 2004). Um grupo foi submetido à conduta observacional e o outro grupo ao RTC para a prevenção profilática primária do AVCI. O estudo foi interrompido antes do prazo previsto da finalização uma vez que mostrou uma diminuição de 92% do risco do primeiro AVCI no grupo submetido ao RTC. Crianças com a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral na ACM ou na ACI igual ou superior a 200 cm/s possuem risco de 10% ao ano de desenvolverem AVCI, que pode ser reduzido para menos de 1% com o RTC (Adams et al. 1998). A partir destes resultados, o National Institute of Health (NIH) dos EUA recomendou a realização do DTC em crianças dos 2 aos 16 anos de idade com AF para avaliação do risco de desenvolvimento de AVCI e o RTC como medida preventiva para as crianças sob alto risco (Adams et al. 1998).

Atualmente a triagem com o DTC é a ferramenta padrão para a prevenção do primeiro AVCI nas crianças com AF (Adams. 2005; Brewin J et al. 2017; DeBaun MR et al. 2020), através da aferição do tempo de elevação da velocidade média máxima (TAMMV) das grandes artérias intracranianas do polígono de Willis (ACM e ACI) (Adams et al. 1998). A definição de DTC AR é quando a velocidade média máxima (VMM) é maior ou igual a 200cm/s na ACM ou na ACI, de risco condicional (RC) quando a VMM entre 170cm/s a 199 cm/s e de baixo risco ou normal (BR) quando <170cm/s (Adams et al. 1998). Os achados de um DTC anormal sugerem o aumento das velocidades do fluxos sanguíneos cerebral, decorrente do estreitamento da artéria, podendo ser reversível nos estágios iniciais da AEO, antes do desenvolvimento da hiperplasia da camada íntima e da medial (Steen et al. 2003; Deane et al. 2010; Hulbert et al. 2011; Telfer et al. 2011; Gueguen et al. 2014; Kennedy et al. 2014). Após a detecção do DTC de AR em dois exames consecutivos, realizados num intervalo de 30 dias, a criança será submetida ao tratamento preventivo com o RTC realizado com concentrado de hemácias

fenotipadas (CHF) mensalmente, com o objetivo principal de diminuir a HbS para <30%.

Crianças portadoras de AF com velocidades do DTC com risco condicional (170-199 cm/seg) podem desenvolver acidente vascular cerebral. (Adams RJ et al. 1998; Hankins JS et al. 2015). Embora o risco de AVC primário seja menor naqueles que apresentam DTC na faixa de risco condicional em relação aos AR (2 - 5% versus 9% por ano), há mais pacientes com velocidades condicionais do que anormais do DTC (prevalência de 17% versus 9%), e o número absoluto de crianças que podem desenvolver AVC é aproximadamente equivalente entre estas duas categorias (Adams RJ et al. 2004; Hankins JS et al. 2008). O risco de conversão do TCD de velocidades condicionais para velocidades anormais é substancial e varia de 15 a 55% (Adams RJ et al. 2004, Hankins JS et al. 2015). Uma vez que a conversão ocorra, o tratamento estabelecido é a terapia transfusional crônica (Adams RJ et al. 1998), representando um fardo substancial para pacientes e familiares e especialmente trazendo os riscos dos efeitos adversos inerentes à RTC (DeBaun MR et al, 2020), porém terapias formais para os pacientes com DTC condicionante ainda não foi estabelecida (DeBaun MR et al, 2020).

Estudos comprovam a eficácia do uso da hidroxiureia (HU) na diminuição das velocidades do DTC (Kratovil T et al. 2006; Zimmerman SA et al. 2007; Hankins JS et al. 2015, Adegoke SA et al. 2018), sendo seu maior benefício o aumento da HbF. Adegoke e colaboradores (2018) encontraram reversão de 69,2% de DTC condicionante para normal em pacientes em uso de HU versus 36,8% no grupo sem uso de HU, além de que, no grupo do uso de HU não houve nenhuma conversão para o DTC de AR, enquanto no grupo sem uso de HU a conversão foi de 5,3% (Adegoke. et al, 2018).

A prevalência de DTC de AR varia amplamente conforme a população estudada. No estudo multicêntrico STOP, realizado nos EUA e Canadá, cerca de 9% dos participantes apresentaram exame de AR (Adams et al. 1998), na França, 14,8% (Bernaudin et al. 2005), Reino Unido, 6,5% (Rees et al. 2009) e na África 6,9% (Cox et al. 2014). Em estudo multicêntrico no Brasil, das 773 crianças estudadas, 88,1% foram baixo risco, 7% risco condicionante e 4% foram AR (Leite et al. 2012).

O DTC é um instrumento preditor sensível de risco de AVCI (Adams et al.

1992; Adams et al. 1997; Adams et al. 1998; Adams et al. 2004; Lee et al. 2006; Bernardin et al. 2011; Leite et al. 2012; Bernaudin et al. 2016), porém, de baixa especificidade, uma vez que aproximadamente 60% dos pacientes com DTC de AR não terão AVCI, isto é, para evitar a ocorrência de um episódio de AVCI, seria necessário submeter seis a sete crianças ao RTC (Adams RJ et al. 1997; Jordanet al. 2012; Lagunju IA et al. 2013) de acordo com as condutas preventivas atuais, causando a exposição desnecessária aos efeitos adversos deste tratamento, como a infecção, aloimunização e sobrecarga de ferro (Adams et al. 1997; Akinsheye et al. 2010; Buchanan et al. 2010; Helton et al. 2014; Hasson et al. 2019). O DTC apresenta outras limitações como a restrição de sua aplicabilidade apenas a pacientes jovens, dos 2 aos 16 anos de idade e necessita da colaboração da criança (Salama K et al. 2020). Alguns pacientes apresentam impossibilidade da realização do exame por causa da maior espessura da tábua óssea craniana, indisponibilizando a janela acústica (Adams et al, 2004 Hoppe et al. 2007). Pequenos segmentos de estenose podem passar despercebidos quando executados por profissionais pouco experientes (Salama K et al. 2020). A adesão aos programas de rastreamento pelo DTC enfrenta problemas ao redor do mundo (Phillips SM, et al. 2021). Em torno de 1/3 de pacientes não realizam o DTC. (Fullerton et al. 2006; Raphael et al. 2008; Rees et al. 2008; Eckrichea et al. 2013; Lagunju et al. 2014). Nem todos os centros de tratamento à AF têm acesso ao DTC ou mesmo ao RTC, principalmente em países em desenvolvimento (Ali SB et al. 2011) pelo alto custo destes procedimentos (Bernaudin F et al. 2011 Wayne AS et al. 2000). Existe um número restrito de profissionais treinados que sabem interpretar corretamente os resultados do DTC (Fullerton et al. 2006). Soma-se à rejeição ao RTC, ainda considerada alta, tanto pelos responsáveis, quanto pelos profissionais de saúde (Lagunju IA et al. 2013), por causa da duração indeterminada do tratamento (DeBaun MR et al. 2020), efeitos adversos do RTC, alto custo e dificuldades na disponibilidade de sangue (Lagunju IA et al. 2013).

2.4.2.3.2 Hidroxiuréia

A hidroxiuréia (HU) é atualmente a mais efetiva terapia moduladora da doença na AF. Seu impacto terapêutico tem como pilar central o aumento da síntese de HbF (McGann et al. 2019; Runge A et al. 2022), além de reduzir os níveis

de neutrófilos e reticulócitos pela citotoxicidade da medula óssea (Charache S et al 1995; Barazia A et al. 2015), redução da aderência da Hc ao endotélio, redução dos níveis de moléculas de adesão (Wali Y et al. 2012; Allali S et al. 2020), aumento das espécies de NO, com provável relação com a indução da HbF (Rankine-Mullings AE and Nevitt SJ. 2021). É uma droga eficaz e segura (Guyatt et al. 2011; Ford et al. 2018). Sua indicação tem sido estendida para lactentes no intuito da prevenção aguda e crônica das complicações da doença (Wykes C and Rees DC. 2011; Kim. 2014; Faye et al. 2017; Ford et al. 2018).

O uso da HU é capaz de reduzir significativamente as velocidades do DTC (Adegoke, SA et al. 2018) sendo útil e efetivo para a prevenção do AVCI em situações onde não é possível a realização do RTC, especialmente em crianças que nunca tiveram o AVCI (Hankins JS, et al. 2015; Rankine-Mullings A et al. 2021). Para aquelas crianças com AF, entre 2 a 16 anos que possuem DTC AR e que estejam recebendo o RTC como prevenção do AVCI primário, o guideline clínico americano de 2020 (DeBaun MR et al. 2020) recomenda que, após 1 ano de RTC, com normalização das velocidades do DTC e com ressonância magnética e angiografia por ressonância magnética (ARM) do cérebro sem evidência de vasculopatia grave, seja suspenso o RTC e mantido o tratamento com hidroxiureia na dose máxima tolerada, baseado no estudo Transcranial Doppler with Transfusions Changing to Hydroxyurea (TWITCH) (Ware RE et al. 2016), evitando-se os riscos e desvantagens da RTC (Ali et al. 2011; Bernaudin et al. 2016).

2.4.2.3.3 *Novas terapias*

Nas últimas duas décadas, com o avanço do estudo da biologia molecular, novos agentes terapêuticos surgiram (Steiberg, 2020b), com potencial para a prevenção primária e secundária do AVC (<http://ClinicalTrials.gov>: NCT02850406, NCT05018728, NCT04218084, NCT05228834, NCT05334576, NCT05371184), alguns deles já aprovados pelos órgãos regulatórios de alguns países, outros em fase de pesquisa para o tratamento da DF (Araújo ADS et al. 2023).

Aprovada em 2017 pelo FDA para uso em crianças maiores que 5 anos e adultos (Ballas SK.2020), a L-glutamina é um precursora da síntese da glutathione, NAD e arginina, que protegem a Hc do dano oxidativo e indiretamente mantem o tônus vascular (Quinn CT. 2018). Esta droga é de uso oral e mostrou ser eficaz na

redução do número de crises álgicas, hospitalização e transfusões de concentrado de hemácias (Niihara Y et al. 2018, Araújo ADS et al. 2023).

O Crizanlizumab é um anticorpo monoclonal, da classe IgG que se liga à P-selectina, inibindo-a, bloqueando sua interação com seu ligante, o PSGL-1 (do inglês *P-selectin glycoprotein ligand-1*), reduzindo aderência das células sanguíneas ao endotélio (Araújo ADS et al. 2023). Foi aprovado pelo FDA em 2019 nos EUA para o tratamento de portadores de AF (Blair HA. 2020), sendo observada a diminuição das crises álgicas (Ataga KI et al, 2017; Kutlar A et al. 2019; Allali S et al. 2020).

O voxelotor é um medicamento de uso oral, com ação de inibição da polimerização da HbS através da ligação, de forma reversível, à cadeia alfa da Hb, modulando a afinidade da Hb com o oxigênio e prevenindo a falcização da HbS (Engel ER et al. 2020; Herity LB et al. 2021). Aprovada pelo FDA em 2019 e atualmente prescrita para crianças com AF maiores que 4 anos, o voxelotor mostrou eficácia em aumentar de forma significativa o nível total da Hb em pelo menos 1 g/dL em relação ao placebo (51% vs 7%, $p < 0,001$) (Vichinsky E et al. 2019, Araújo ADS et al. 2023).

A terapia gênica é mais uma opção curativa para a AF. O objetivo é substituir o gene anormal por novo material genético, fornecendo um potencial de cura da doença sem a necessidade de um doador de medula óssea e sem a toxicidade associada ao regime de condicionamento tradicional utilizado no transplante de células tronco hematopoiéticas. (Engel ER et al. 2020). Existem duas estratégias básicas nesta opção terapêutica: a edição gênica, quando um vetor de DNA é projetado para se integrar em um ou mais loci nos cromossomos do paciente (edição genética), ou a técnica de adição gênica, quando um vetor é utilizado para ser expresso em um gene pós mitótico de vida longa ou em uma célula que se divide lentamente (adição de genes). Neste último caso, o DNA (do inglês deoxyribonucleic acid) transferido é estabilizado extracromossomicamente (High KA and Roncarolo MG. 2019; Araújo ADS et al. 2023).

2.4.2.4 Moduladores genéticos do AVCI

Estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar os fatores de risco associados com a doença cerebrovascular em portadores da AF. Alguns

genes foram escolhidos por seu envolvimento nos mecanismos fisiopatológicos da patogênese da DCV, como os envolvidos na angiogênese, inflamação, regulação do tônus vascular, proliferação celular, apoptose e coagulação (Hoppe C et al. 2004; Sebastiani P, et al. 2005; Flanagan JM et al. 2011; Flanagan JM et al. 2013, Belisário et al, 2015; Belisário et al. 2016), alguns destes representados no quadro 1.

Quadro 1– Polimorfismos associados à DCV na AF.

Gene	Cromossomo	Polimorfismo	MAF	Proteína codificada	Função	Consequência
<i>ANXA2</i>	15 (15q22.2)	rs11853426 Região regulatória	49%	Anexina 2	Regulação e produção da plasmina	Aumento dos eventos trombóticos
<i>ADCY9</i>	16(16p13.3)	rs2238432 Região 3'UTR	38%	(AC9)	Transdução dos sinais neuronais	Defeito na transdução de sinais neuronais
<i>TEK</i>	9(9p21.2)	rs489347 Variante intrônica	35%	Tie2	Regulação da angiogênese, e da expressão das moléculas de adesão celular	Estado pró inflamatório.
<i>TGFBR3</i>	1(1p22.1)	rs284875 Região promotora	37%	TGFBR3	Regulação inflamatória e imunológica.	Doença Cerebrovascular, estado pró-inflamatório
<i>ENPP1</i>	6(6q23.2)	rs1044498 Variante missense	32%	PC1	Sinalização purinérgica	Aumento da pressão sanguínea e diminuição da síntese do NO no endotélio

Fonte: Flanagan, JM (2011) Blood.

Hoppe e colaboradores (2004) estudaram 104 SNPs (do inglês *single nucleotide polymorphisms*) em 65 genes candidatos e encontraram associações de risco para DCV de grandes vasos às variantes *TNF* (-308)GG e *IL4R* 503P (Hoppe C et al. 2004). Flanagan e colaboradores (2011), encontraram 38 polimorfismos em 22 genes e apenas 4 genes tiveram associação validada com o risco do AVC na AF, sendo *ADCY9* associado à proteção contra o AVC e os genes *TEK*, *ANXA2* e *TGFBR3* associados a maior risco de AVC (Flanagan JM et al. 2011). Posteriormente o mesmo autor reportou um estudo de genoma de ampla associação (GWAS, do inglês *genome-wide association study*) para AVC na AF, onde encontrou variantes nos genes *GOLGB1* e *ENPP1* associadas à proteção contra o AVC (Flanagan et al. 2013). Belisario e colaboradores (2015), por sua vez, não encontrou associação de proteção contra o risco de AVC com a mutação *GOLGB1* Y1212C, como proposto por Flanagan *et al*, 2013 e, por outro lado, encontrou que a variante *ENPP1* K173Q foi associada com aumento de risco para AVC (Belisario et al. 2015). O quadro 2 lista os estudos aqui mencionados.

Quadro 2– Resultados de estudos sobre a associação de polimorfismos à doença cerebrovascular na anemia falciforme.

Autor	ADCY9 rs2238432	TEK rs489347	ANXA2 rs11853426	TGFBR3 rs284875	GOLBB1	ENPP1 rs1044498	TNF rs1080629	IL4
Hope <i>et al.</i> 2004	-	-	-	-	-	-	Risco aumentado (308)GG	Risco aumentado 503P
Sebastiani <i>et al.</i> 2005	Risco diminuído	Risco aumentado	Risco aumentado	Risco aumentado	-	-	-	-
Flanagan <i>et al.</i> 2011	Risco diminuído	Risco aumentado	Risco aumentado	Risco aumentado	Não houve associação	Não houve associação	-	-
Flanagan <i>et al.</i> 2013	-	-	-	-	Risco diminuído	Risco diminuído	-	-
Belisário <i>et al.</i> 2015	-	-	-	-	Não associado	Risco aumentado	-	-
Belisário <i>et al.</i> 2016	Não houve associação	Risco aumentado (GC ou GG)	Não houve associação	Risco aumentado (GA ou AA)	Não houve associação	Risco diminuído	Não houve associação	Não houve associação

Fonte: Hope *et al.* 2004, Sebastiani *et al.* 2005, Flanagan *et al.* 2011 e 2013, Belisário *et al.* 2015 e 2018

2.4.2.4.1 Polimorfismo rs11853426 do gene ANXA2

O gene *ANXA2*, localizado no cromossomo 15 (15q22.2), codifica a proteína Anexina A2 (Anx2). As anexinas são proteínas que participam dos processos relacionados ao transporte e comunicação celular, através da membrana plasmática, como a endocitose e exocitose, fusão membranar, interações membrana/citoesqueleto e regulação de canais cálcio-dependentes (Faure *et al.* 2002; van de Graaf *et al.* 2003) além de participarem do metabolismo ósseo, regulando o balanço entre a osteogênese e a reabsorção óssea, na regulação do crescimento celular e transdução de sinal, sobretudo no tecido endotelial e no processo de coagulação sanguínea (Flood and Hajjar 2011).

A Anexina A2 está relacionada à regulação do processo de divisão celular, via regulação do anel citocinético (Benaud *et al.* 2015). A ausência de Anx2 compromete todo o processo de divisão celular uma vez que induz à falha nos estágios iniciais de formação do anel citocinético, disfunção no arranjo dos filamentos de actina, diminuindo sua polimerização, disfunção no arranjo dos microtúbulos do citoesqueleto, levando a uma perda de organização espacial dos componentes celulares (Benaud and Prigent 2016).

A Anx2 citoplasmática forma um complexo membranar estável com a proteína acessória p11, membro da família de proteínas S100 (S100A10),

composto por duas subunidades de Anx2 e p11 (A2-p11) (Bharadwaj et al. 2013). O complexo Anx2-p11 desempenha um papel importante na regulação dos processos hemostáticos na superfície das células endoteliais, aumentando a atividade catalítica do ativador tecidual do plasminogênio (tPA) na conversão do plasminogênio (Plg) em plasmina (principal enzima fibrinolítica), viabilizando o processo de dissolução da fibrina (Chasserot-Golaz et al. 2005; Fan et al. 2010; Zhu et al. 2010; Flood and Hajjar. 2011).

Ling e colaboradores (2004), estudando o papel fisiológico da Anx2 em camundongos nocauteados para *ANXA2* (*Anxa2*^{-/-}), demonstraram a deposição de fibrina no interior da microvasculatura destes animais, tornando-os mais propensos ao desenvolvimento de trombos quando comparados com os animais saudáveis (*Anxa2*^{+/+}) (Ling et al. 2004). Em 1999, Jacob Rand (Rand. 1999) propôs o termo “Anexinopatias” para classificar um novo conjunto de doenças, cujos membros da família das anexinas, atuam de modo desregulado, participando da fisiopatologia destas doenças. A primeira doença considerada uma anexinopatia foi a leucemia promielocítica aguda (LPA), descrita por Menell e colegas (Menell et al. 1999). Os autores demonstraram que os blastos leucêmicos da LPA expressavam altos níveis de Anx2, levando a uma fibrinólise exacerbada nestes pacientes, contribuindo assim para os eventos hemorrágicos nesta doença.

Uma análise de 108 SNP's em 39 genes candidatos revelou variações em *ANXA2*, estabelecendo uma associação com maior risco de AVC em pacientes com AF (Sebastiani et al. 2005). Um segundo estudo independente, apresentou resultados semelhantes em crianças com DF com polimorfismo rs 11853426 do gene *ANXA2* (Flanagan et al. 2011). Polimorfismos em *ANXA2* foram associados com o surgimento de osteonecrose na AF (Baldwin et al. 2005). Estes resultados sugerem que a Anx2 pode atuar como um modificador importante das formas de expressão clínica da AF, bem como de seu curso natural (Hedhli et al. 2012).

Diversos polimorfismos no gene *ANXA2* já foram descritos, evidenciando redução nos seus níveis de expressão, seja modulando a ligação dos fatores de transcrição e/ou acentuadores aos seus sítios específicos (Baldwin et al. 2005), conduzindo a um estado de maior estase vascular, podendo levar ao risco aumentado das complicações trombóticas, como o AVC e acentuando o aparecimento de crises vasoclusivas (CVO's) (Flanagan et al. 2011).

2.4.2.4.2 Polimorfismo rs2238432 do gene *ADCY9*

As adenilatos ciclases (ACs) são enzimas transmembrana plasmática que catalisam a conversão do ATP para cAMP (adenosina-3',5'-monofosfato), segundo mensageiro no metabolismo celular que transmite sinais extracelulares para efetores intracelulares, particularmente a proteína quinase A (PKA), responsável pela ativação de múltiplas vias de transdução de sinal (Hacker et al. 1998; Sunahara et al. 2002). As ACs regulam diversas respostas fisiológicas, incluindo metabolismo lipídico e de carboidratos, crescimento e diferenciação celular. A AC9 (adenilato ciclase do tipo 9) humana, uma das 10 isoformas de AC, é uma proteína de 1294 aminoácidos que contém dois módulos com seis hélices transmembrana cada; ambos necessários para a atividade catalítica (Sunahara et al. 2002).

A AC9 é expressa em várias células do pulmão, com maior expressão no músculo liso das vias aéreas (Small et al. 2003). É estimulada pela subunidade α da proteína Gs e inibida pelas Gi (Yan et al. 1998; Sunahara et al. 2002). Está envolvida na mediação da sinalização dos receptores β_2 adrenérgicos (β_2AR), ativando a proteína quinase A, que fosforila as múltiplas proteínas no músculo liso das vias aéreas (Teixeira, 2017). O gene que codifica a AC9, *ADCY9* contém 11 éxons e abrange, estruturalmente, uma região de 153 kilobases (Ludwig and Seuwen, 2002), localizado no braço curto do cromossomo 16, na posição 16p13.3 (Hacker et al. 1998). O mRNA do *ADCY9* está presente em todos os tecidos e de forma mais importante, no músculo esquelético, coração e cérebro onde é altamente expresso nos astrócitos e tem papel essencial para transdução de sinais neuronais (Hacker et al, 1998). O polimorfismo rs2238432 do gene *ADCY9* é resultado da troca da base nitrogenada guanina por adenina (G/A). Na literatura, este polimorfismo foi associado à diminuição do risco do AVC, na AF (Sebastiani et al. 2005), (Flanagan et al, 2011).

2.4.2.4.3 Polimorfismo rs489347 do gene *TEK*

O gene *TEK*, conhecido também como *TIE2* ou *HYK*, localizado no cromossomo 9p21.2 (Sebastiani et al. 2005) é um membro da família de receptores de tirosina com um domínio quinase altamente conservado ao longo das espécies. Ele é expresso em maior quantidade no endotélio de artérias e veias, mas também

já foi isolado em células neuronais, epiteliais, cardíacas e renais, além de ser também encontrado em precursores hematopoéticos e outros tecidos (Du Z et al. 2017).

O Tie2 possui um domínio quinase citoplasmático e uma zona dita como funcional que é dividida em 4 subdomínios: o C-terminal, N-terminal, cauda C-terminal e o domínio de inserção. Mutações nessas regiões podem causar desordens fisiológicas ligadas a sinalização e funções exercidas pelo receptor (Du Z et al. 2017; Parikh, 2017). Através da fosforilação e regulação balanceadas pelos seus ligantes específicos, o Tie2, desempenha diversas funções, sendo as mais evidentes a da regulação da angiogênese, regulação da expressão de moléculas de adesão, remodelação e integridade vascular. Devido a variedade da expressão tecidual do receptor, o Tie2 tem sido relatado como participante de diversas situações patológicas como inflamação, câncer, diabetes, doenças oculares e sepse. (Eklund L et al. 2016; Khan et al. 2014).

Os ligantes do Tie2, Angiopoetina 1 (ANGPT-1) e Angiopoetina 2 (ANGPT-2), apesar de serem homólogos entre si, desempenham funções distintas sobre o receptor. A ANGPT-1 desempenha papel de agonista do receptor enquanto que a ANGPT-2 atua como antagonista. (Parikh, 2017a). O Tie2 faz parte de um complexo de receptores composto por ele e pelo Tie1, onde a ligação da ANGPT – 1 ao Tie2, através do domínio C-terminal, provoca uma dissociação do Tie2 do complexo, levando a uma dimerização e autofosforilação. A ativação do Tie2 pela ANGPT-1 desencadeia uma cascata de sinalização que promoverá sobrevivência celular, integridade vascular, resposta anti-inflamatória/ antiapoptótica através da diminuição de produção da citocina pró-inflamatória NFkB e redução da permeabilidade vascular através do aumento da interação actina- miosina via VE-caderina no endotélio. Essa diversidade de funções é justificável pelo fato de que durante a cascata de sinalização desencadeada pela ativação do Tie2, outros receptores de tirosina quinase são transfosforilados, que levam, por exemplo, a síntese do fator ativador de plaquetas (PAF). A ANGPT-2 age como um antagonista competitivo, onde a sua ligação ao Tie2 inibe a cascata de sinalização reduzindo a estabilidade venosa e aumentando as chances de remodelação vascular, bem como promove um estado pró-inflamatório. A tirosina fosfatase transmembrana vascular-endotelial (VE-PTP) promove inibição física da sinalização do Tie2 quando estimulada pelos seus ligantes (Khan et al. 2014; Parikh, 2017a, 2017b; Higgins et

al. 2018).

Diante de um contexto de um endotélio sob condições normais de estímulo, a ativação do Tie2 pela ANGPT-1 gera inibição do fator de transcrição FOXO1 que é responsável pela transcrição de ANGPT-2, havendo um equilíbrio na produção e liberação da ANGPT-2 dos corpos de Weibel Palade. Diante de uma situação de inflamação e estresse vascular, células endoteliais recebem o estímulo de liberação de ANGPT-2 gerando um looping de feedback positivo onde a quantidade solúvel de ANGPT-2 supera a quantidade de ANGPT-1 e a expressão do receptor Tie2 é diminuída (Khan et al. 2014; Eklund et al. 2016; Parikh, 2017b).

No contexto da AF, a maior aderência das hemácias contendo HbS ao endotélio, hemólise e hiperativação dos leucócitos, levam a um microambiente vascular inflamatório devido a liberação diversas citocinas pró-inflamatórias (Zago e Pinto, 2007). Diante desse cenário, o equilíbrio homeostático entre ANGPT-1, ANGPT-2, Tie2, Tie1 e VE-PTP é rompido e um estado caótico é instalado onde a produção de ANGPT-1 é diminuída juntamente com a expressão de Tie2. A produção de ANGPT-2 é aumentada através da ativação do FOXO1, responsável pela transcrição de ANGPT-2, levando para um cenário pró-inflamatório, onde há o aumento da expressão de moléculas de adesão como o VCAM-1 e o ICAM-1, aumento na produção de NFkB, perda da estabilidade vascular e aumento na permeabilidade endotelial. Também há a diminuição da ativação de Óxido Nítrico Sintetase Endotelial (eNOS) e liberação de óxido nítrico (NO), potente vasodilatador (Parikh, 2017b). Todos esses fatores podem contribuir para eventos de vaso-oclusão como o AVC, infarto e isquemia tecidual, tornando o *TEK* um candidato a modulação genética da AF.

O AVC é uma manifestação clínica da anemia falciforme que já foi associados com o polimorfismo rs489347 do gene *TEK* (Sebastiani et al. 2005). decorrente da troca de uma base nitrogenada citosina por uma guanina (Parikh, 2017a) e que possui um *minor allele frequency* (MAF) de 0,35. Em um estudo realizado por Flanagan e colaboradores em 233 crianças com anemia falciforme foram genotipadas 22 genes e 38 SNPs diferentes, previamente associados ao risco para o AVC na literatura. Foram encontradas associações significativas com o aumento de risco no desenvolvimento de AVC com 4 polimorfismos, dentre eles o rs489347 do gene *TEK* (Flanagan et al. 2011). Belisário et al, encontraram que o SNP *TEK* rs489347 foi associado mais uma vez ao aumento de risco para o AVC,

nas análise unifatorial e multifatorial do estudo. A genotipagem das 395 crianças incluídas no estudo, aquelas com pelo menos um alelo G (CG ou GG) apresentaram três vezes mais risco para isquemia cerebral aguda do que as crianças com o genótipo CC (Belisário et al. 2016).

2.4.2.4.4 Polimorfismo rs284875 do gene *TGFBR3*

Os fatores de crescimento transformador β (TGF- β), conjunto de citocinas multifuncionais, modulam processos de desenvolvimento e reparo de tecidos como a diferenciação celular, progressão do ciclo celular (proliferação ou morte da célula), adesão e migração celular, produção de matriz extracelular e participação da resposta imune (Nolan et al. 2006Chen et al. 2012). O TGF- β é considerada uma citocina anti-inflamatória e reguladora do sistema imunológico. Existem três isoformas de TGF- β , reguladas por genes distintos (TGF- β 1, - β 2 e - β 3) cujas funções dependerão de outros fatores de crescimento, do tipo de célula, estado de diferenciação e crescimento, (Govinden and Bhoola, 2003).

Assim como existem 3 isoformas do TGF- β , existem três receptores de TGF- β (TGFBRs) envolvidos em suas vias de sinalização: o receptor dos tipo I (TGFB1), II (TGFB2) e III (TGFB3) codificados por genes diferentes. Os receptores TGFB1 e TGFB2 são responsáveis pela transdução de sinalização e o TGFB3 pela regulação e mediação da transdução da sinalização de TGF- β (Chen et al. 2012). O TGFB3, codificado pelo gene *TGFB3* é um proteoglicano de membrana que funciona como um co-receptor juntamente com outros membros da superfamília de receptores de TGF- β (Pruitt et al., 2014). O TGFB3 aumenta a ligação de TGF- β ao TGFB1 e ao TGFB2. Nos últimos anos, porém, mais funções do TGFB3 foram identificadas, expandindo seu papel de simples co-receptor para um receptor mais amplo e complexo influenciando o tráfego de receptores TGFB1 e TGFB2, regulando assim a sinalização do TGF- β (Groeneveld et al., 2018). O papel do TGFB3, como facilitador da ligação do TGF- β aos receptores de sinalização é mais evidente com TGF- β 2.

O AVC é diretamente associado a variantes no *TGFB3* e indiretamente associado a variantes no *TGFB2*, que possuem papéis importantes na sinalização do TGF- β . Polimorfismos no gene *TGFB3* são associados ao AVC (Sebastiani P et al. 2005), além de apresentar relação com a necrose avascular, priapismo,

úlceras de pernas, hipertensão pulmonar e infecções bacterianas (Driss et al. 2009). Belisário e colaboradores (2016) associaram o SNP *TGFBR3* rs284875 a um aumento do risco de DTC de alto risco, onde crianças portadoras de AF com pelo menos um alelo A mutante tinha a chance de DTC de alto risco que era 3,4 vezes maior em comparação com aqueles com o genótipo GG. O mecanismo desta associação não ficou bem esclarecido neste estudo (Belisário et al. 2016). O mesmo polimorfismo rs284875 foi associado (Sebastiani et al. 2005) e validado (Flanagan et al. 2011) como fator de risco para o desenvolvimento de acidente vascular cerebral em indivíduos com AF.

2.4.2.4.5 Polimorfismo rs1044498 do gene *ENPP1*

O Ectonucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase 1 (*ENPP1*), também conhecido como PC1, é uma glicoproteína transmembrana de classe II presente tanto na membrana plasmática quanto no retículo endoplasmático de diversos tecidos incluindo fígado, músculo esquelético, tecido adiposo e cérebro. O seu gene, também chamado de *ENPP1*, está localizado na banda 6q23.2 do cromossomo 6 (Goldfine et al. 2008). O PC1 tem como função a clivagem de várias moléculas, incluindo ligações fosfodiéster de nucleotídeos e açúcares de nucleotídeos. O seu principal substrato é o ATP. O domínio catalítico desta enzima possui dois íons de zinco no sítio ativo (Kato et al. 2012). O grupo fosfato do ATP se liga entre esses dois íons para desencadear o processo de clivagem da ligação e produzir monofosfato de adenosina (AMP) e pirofosfato (PPi). Desse modo, o *ENPP1* desempenha um papel crucial na sinalização purinérgica (Harahap e Godin, 1988; Sortica et al. 2015). As purinas e nucleosídeos, tal como adenosina e ATP, possuem um papel importante na regulação das funções cardiovasculares, neurológicas, imunológicas, musculoesqueléticas, hormonais e hematológicas. Especificamente, essa via está envolvida na agregação plaquetária, contração muscular, proliferação celular, migração, diferenciação e apoptose, bem como na regulação da hipóxia e isquemia nos tecidos. (Stella et al. 2016; Onyedibe KI et al. 2019).

Por ser um grande gerador de pirofosfato, o *ENPP1* também atua na mineralização óssea e calcificação de tecidos moles (Nam HK et al. 2011). Deste modo, o pirofosfato é importante na prevenção do acúmulo de depósitos anormais

de cálcio (calcificação) e outros minerais (mineralização) no corpo. Portanto, mutações de perda de função no gene ENPP1 é a causa principal de calcificação arterial em pacientes com calcificação infantil (Nam HK et al. 2011). Além disso, o ENPP1 é capaz de inibir a atividade da subunidade beta da tirosina quinase do receptor de insulina (RI) e a subsequente sinalização celular, causando resistência à insulina (Pizzuti et al. 1999; Moehlecke et al. 2010). O polimorfismo K173Q (rs1044498) (A>C), frequentemente denominado K121Q devido a um erro em estudos iniciais do ENPP1, é resultante da substituição de uma lisina (K) por uma glutamina (Q) no códon 173 do segundo domínio similar de somatomedina-b (SMB2) do gene ENPP1 (Sortica et al. 2015).

Esse polimorfismo vem sendo amplamente investigado, pois diversos estudos mostraram um aumento da atividade inibitória, reduzindo a autofosforilação do receptor de insulina. Em um estudo multicêntrico, a variante 173Q foi associada com maior risco de desenvolvimento precoce de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e infarto agudo do miocárdio quando comparado ao alelo 173K (Bacci et al. 2005). Além disso, o SNP ENPP1 K173Q é capaz de aumentar a atividade do ENPP1 intracelular e os níveis séricos da enzima ENPP1, elevando os níveis extracelulares de PPi, o que pode ser um fator protetor contra a calcificação vascular (Flanagan et al. 2013).

A variante Q173 foi significativamente associada à redução da atividade da sintase do NO em células endoteliais humanas (Bacci et al. 2009). Outros fenótipos associados a este polimorfismo incluem aceleração do processo de aterosclerose (Bacci et al. 2005), elevação do risco para hipertensão (Kubaszek et al. 2004) ou obesidade (Meyre et al. 2005) e aumento da predisposição para o desenvolvimento de nefropatia diabética (Canani et al. 2002). No entanto, o papel preciso do polimorfismo K173Q no desenvolvimento de complicações vasculares da DM2, especialmente em relação à doença cardiovascular aterosclerótica, ainda não está totalmente esclarecido (Moehlecke et al. 2010). Nos últimos anos alguns estudos encontraram associação entre a variante K173Q e o desenvolvimento de AVC em crianças com AF. Flanagan (2013), Bélisário (2015) e seus colaboradores observaram que a presença desse polimorfismo pode modular o risco de AVC em pacientes com AF.

Devido à heterogeneidade fenotípica da DF, existe grande dificuldade em

se prever quais indivíduos serão mais gravemente afetados (Meier et al. 2012; Serjeant et al. 2017). A identificação precoce de crianças com maior risco de desenvolver um AVC permitiria intervenções precoces, como um programa profilático de transfusão de sangue (Adams RJ et al. 1998; DeBaun MR et al. 2020), terapia com hidroxiureia (Ware RE et al. 2016) ou transplante de medula óssea (Bernaudin F et al. 2016; Gluckman E et al. 2017) antes do desenvolvimento de sequelas motoras e/ou neurocognitivas, diminuindo taxas de morbidade e mortalidade, consequentemente melhorando a qualidade e expectativa de vida em crianças com AF, além da possibilidade de evitar custos de tratamento e manuseio de indivíduos com AVC (Lo W et al. 2008; Bernaudin et al. 2011; Belisário AR et al. 2018). Por outro lado, uma previsão de risco mais precisa evitaria a indicação de terapias arriscadas e potencialmente tóxicas em indivíduos de baixo risco (Lagunju IA et al. 2013). Diante dessas limitações, percebe-se a importância da análise do efeito combinado dos fatores envolvidos no AVC e identificação de moduladores que possam indicar o risco do desenvolvimento de AVC nos pacientes com AF, para que sejam utilizados como ferramenta de suporte aos resultados do DTC.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença dos polimorfismos ANXA2 (rs11853426), TEK (rs489347), TGFBR3 (rs284875), ADCY9 (rs2238432), ENPP1 (rs1044498), a deleção da talassemia alfa (- α 3.7Kb), os haplótipos da β^S globina e os níveis de HbF em uma coorte de pacientes pediátricos com AF, bem como, analisar suas possíveis associações com o risco do desenvolvimento de AVC .

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos ANXA2 (rs11853426), TEK (rs489347), TGFBR3 (rs284875), ADCY9 (rs2238432), ENPP1 (rs1044498), e deleção da alfa talassemia (- $\alpha^{3.7Kb}$) e os haplótipos da β^S -globina em pacientes pediátricos com anemia falciforme;

2 Verificar a existência de associação entre as frequências alélicas e genotípicas encontradas com o desenvolvimento de complicações cerebrovasculares em pacientes pediátricos com anemia falciforme;

3 Avaliar o perfil clínico-laboratorial de pacientes com anemia falciforme que desenvolveram ou não complicações cerebrovasculares (crises álgicas, STA, HbF, contagem de hemácias, Hb total, Ht, VCM, contagem de reticulócitos, de leucócitos e de plaquetas, DHL, e bilirrubinas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPÉCTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP/CCS/UFPE) e ao comitê de ética do HEMOPE. Após a aprovação (CAAE: 58426622.9.0000.5208), foi desenvolvido, obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

4.2 DESENHO DO ESTUDO E CASUÍSTICA

Este trabalho é um estudo do tipo coorte transversal retrospectivo, com comparação interna de grupos, onde os pacientes foram classificados de acordo com o status da doença cerebrovascular (AVC e/ou DTC AR).

O trabalho foi desenvolvido no setor de Hematologia e Biologia Molecular do Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, onde foram realizados os testes moleculares, tendo a Fundação de Hematologia de Pernambuco - HEMOPE como instituição coparticipante, onde amostras foram coletadas e realizadas as análises dos prontuários dos pacientes participantes. Foram incluídos no estudo 402 pacientes com Hb SS que realizam acompanhamento regular no HEMOPE, sendo 193 (48,1%) do sexo feminino e 209 (51,9%) do sexo masculino. A mediana de idade destes indivíduos foi de 14 anos (variação: 4 – 20 anos). Para confirmar o diagnóstico da AF, todas as amostras dos pacientes foram submetidas à análise de restrição de fragmento do gene da globina beta (*HBB*) usando enzima *DdeI* e quantificação das hemoglobinas por cromatografia líquida de alta eficiência.

Para a realização dos experimentos foi necessária a coleta de 4mL de sangue em tubo com EDTA para extração de DNA. Foram excluídos da pesquisa pacientes aparentados, ou com falta de seguimento ambulatorial regular.

A presença do AVC foi definida pelo registro de ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada, com lesão neurológica correspondente aos sinais e sintomas clínicos, conforme definição do AVC já descrita nesta dissertação. Para os resultados de DTC foram considerados como DTC normal pacientes com média da velocidade máxima de fluxo sanguíneo < 170 cm/s, DTC

condicionante, pacientes com média da velocidade máxima de fluxo sanguíneo entre 170 – 199 cm/s e DTC alto risco, pacientes com média da velocidade máxima de fluxo sanguíneo ≥ 200 cm/s. O grupo caso de doença cerebrovascular (DCV) foi composto por indivíduos que apresentaram registro de ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada mostrando lesão neurológica consequente de acidente vascular cerebral (AVC) e por indivíduos com elevada faixa de risco para ocorrência de AVC determinada pela alta velocidade detectada pelo DTC (≥ 200 cm/s) em dois exames subsequentes, com intervalo aproximado de 30 dias.

4.3 DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Os dados clínicos como ocorrência de AVC, resultados de DTC, crise álgica, síndrome torácica aguda, uso de hidroxiuréia e do regime de transfusão crônico, assim como os dados laboratoriais (HbF, hemoglobina total, volume corpuscular médio (VCM), leucócitos, plaquetas, contagem de reticulócitos, desidrogenase láctica e bilirrubina indireta) foram obtidos pela análise de prontuários dos pacientes que compareceram regularmente ao ambulatório de Hematologia da Fundação HEMOPE.

4.4 ANÁLISES MOLECULARES

A extração de DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos do sangue periférico dos pacientes pela técnica de fenol-clorofórmio modificada, estabelecida por Davis et al, 1986. A pureza do DNA foi avaliada utilizando o equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) e a análise qualitativa realizada em gel de agarose 1,0%.

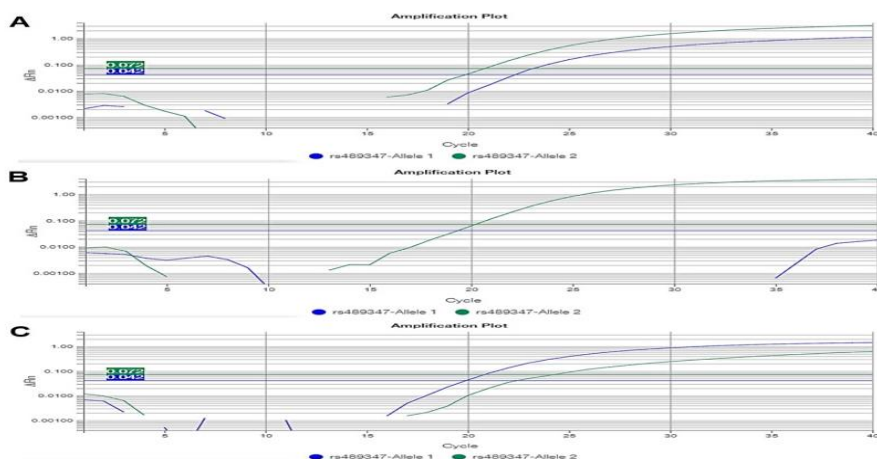
4.4.1 Genotipagem de polimorfismos por PCR em tempo real

Foram selecionados para este estudo os polimorfismos *ANXA2* (rs11853426), MAF(do inglês *minor allele frequency*) =49%, *TEK* (rs489347), MAF=35%, *TGFB3* (rs284875), MAF=37%, *ADCY9* (rs2238432), MAF=38% e

ENPP1 (rs1044498), MAF=32%. A genotipagem dos polimorfismos *TEK* (rs489347), *TGFB3* (rs284875), *ADCY9* (rs2238432), e *ENPP1* (rs1044498) foi realizada através de PCR em tempo real por discriminação alélica utilizando o sistema TaqMan®, que consiste em sondas marcadas com fluorocromos desenhadas especificamente para serem complementares à cadeia de oligonucleotídeos. As sondas utilizadas no estudo estão disponíveis para o uso em pesquisa de caráter científico no site: <<https://products.appliedbiosystems.com> – ID: C___609129_10, C___945105_10, C__16172531_10, C___1207994_20>. Para realização desta técnica, foi utilizado o aparelho QuantStudio 5 Real Time PCR System (Applied Biosystems) disponibilizado no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Instituto Aggeu Magalhães – Recife.

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 H₂O 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 da PCR, foi plotado os sinais de fluorescência para cada amostra e assim discriminando os alelos presentes, conforme recomendações do fabricante (Life Technologies, Califórnia, USA), ilustrado pela figura 17.

Figura 17- Gráfico de amplificação da PCR em tempo real para o polimorfismo *TEK* rs489347. Curvas em azul representam o alelo C e curvas em verde o genótipo G. A) Curva de amplificação para o genótipo heterozigoto CG para o polimorfismo *TEK* rs489347. B) Curva de amplificação para o genótipo homozigoto GG para o polimorfismo *TEK* rs489347. C) Curva de amplificação para o genótipo homozigoto CC para o polimorfismo *TEK* rs489347.



Fonte: Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial – UFPE, 2023.

4.4.2 Genotipagem para o polimorfismo *ANXA2* rs11853426

A determinação do polimorfismo *ANXA2* rs11853426 foi feita por meio de PCR seguida de análise de restrição de fragmentos (PCR-RFLP). A amplificação do fragmento do gene *ANXA2* foi feita utilizando 1 µL de DNA genômico (50 ng) numa reação com volume final de 50 µL, contendo 5 µL de tampão para PCR 10X, 5 µL de MgCl₂ 50mM, 1,5 µL de dNTPs a 10mmol, 1 µL de cada primer a 10pmoles e 0,5 µL de Taq DNA Polymerase. A sequência dos oligonucleotídeos e as condições de amplificação utilizadas estão descritas na tabela 1.

Tabela 1- *Primers* utilizados para amplificação do região do gene *ANXA2* e condições da reação de amplificação.

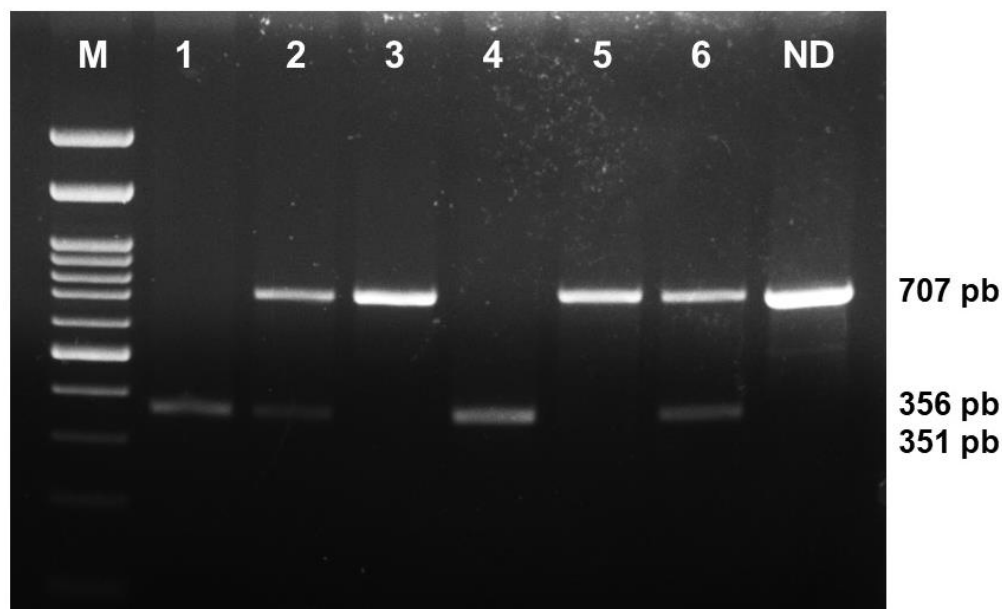
Primers		Sequência do Primer (5´-3´)							
Direto		5'-AATCATGTAGCAGGGCCCG-3'							
Reverso		5'-TGGAGTGTAGTGGTGCGATCA-3'							
Condições de amplificação									
Desnaturação inicial		Desnaturação		Anelamento 35 ciclos		Extensão		Extensão Final	
T(°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
94	5´	94	45"	68	45"	72	45"	72	7´

Fonte: A autora (2023).

Para a digestão enzimática, o produto da amplificação da PCR (707 pb) foi digerido com a enzima de restrição HpyCH4IV (New England BioLabs Inc.) à temperatura de 37°C por 30 minutos, numa reação de volume final de 15 µL (10 µL do produto da amplificação, 1 µL do tampão NEBuffer 10X, 0,25 µL da enzima HpyCH4IV e 3,75 µL de água). Para visualização dos produtos da restrição, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio. O gel foi visualizado para análise dos fragmentos amplificados.

O fragmento contendo o alelo selvagem C em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 356 pb e 351 pb; o fragmento de 707 pb contendo o alelo mutante T em homozigose não apresenta sítio de restrição. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos como ilustra a figura 18.

Figura 18- Análise dos fragmentos do polimorfismo ANXA2 rs11853426. O alelo C cria um sítio de restrição para enzima HpyCH4IV gerando fragmentos de 356 e 351 pares de bases (pb). O alelo T abole o sítio de restrição da enzima demonstrando apenas um fragmento de 707 pb. Amostras 1 e 4 homozigotos CC, amostras 2 e 6 heterozigotos CT, amostras 3 e 5 homozigotos TT. M: Marcador de peso molecular, ND: Controle não digerido (produto da PCR).



Fonte: Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial – UFPE, 2023.

4.4.3 Determinação da mutação $\alpha^{-3,7kb}$

A determinação do genótipo α foi realizada pela técnica de PCR, utilizando os *primers* C2 e C10 na pesquisa da deleção $\alpha^{3,7Kb}$, como descrito por Dodé e cols. (1993). A Tabela 2 mostra a sequência dos *primers*.

Tabela 2- Sequências dos *primers* para pesquisa da deleção $\alpha^{3,7Kb}$. Localização referente ao gene α no cromossomo 16 depositados no banco de dados NCBI (ID: J00153).

<i>Primers</i>	Sequência do <i>Primer</i> (5´-3´)	Direção	Posição
C2	CCATGCTGGCACGTTTCTGA	AS	11365
C10	GATGCACCCACTGGACTCCT	S	5641

S = Sense; AS = Anti-sense.

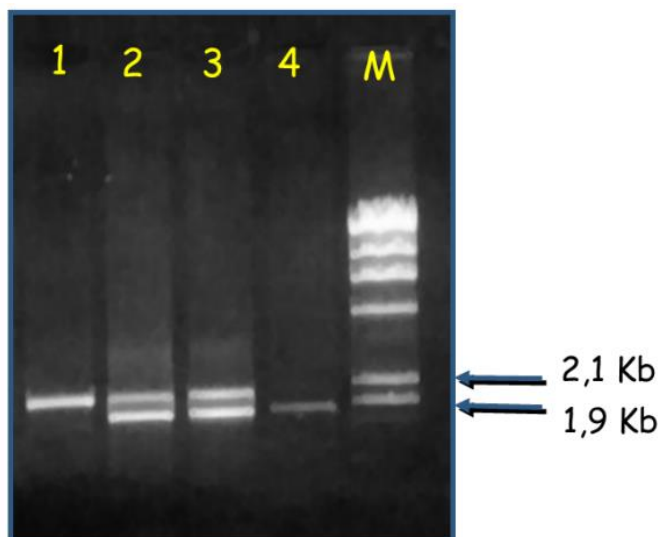
Fonte: A autora (2023).

Foi utilizada a seguinte reação de PCR: 1,0 μ l de DNA (250ng); 2,5 μ l de tampão α^* ; 2,5 μ l de DMSO; 0,75 μ l de dNTP 10mM; 0,5 μ l de cada *primer* 10 μ M; 0,25 μ l de taq polimerase 5U/ μ l, em um volume final de 25,0 μ l de água. Condições de ciclagem: desnaturação inicial 94°C - 10'; 30 ciclos: 94°C - 45'';

56°C - 1' e 72°C - 1'; extensão final 72°C - 7'. Para o tampão α foi utilizado o seguinte protocolo - Soluções estoque: 3,35 ml de Tris-HCl 2M (pH 8,6); 1,66 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M; 250 μl de MgCl_2 1M; 33,5 μl de Na_2EDTA 0,2M; 85 μl de BSA-20 mg/ml; 70 μl de β mercaptoetanol 14,3M, para um volume final de 10 ml com dH_2O . Todas as soluções estoque foram autoclavadas, exceto MgCl_2 que é filtrada.

Na pesquisa da $-\alpha^{3,7\text{Kb}}$, o produto amplificado gera um fragmento de 2,1kb para o haplótipo normal ($\alpha\alpha$) e de 1,9kb para o haplótipo mutante ($-\alpha^{3,7\text{Kb}}$) como mostra a figura 19.

Figura 19- gapPCR para análise da deleção $-\alpha^{3,7\text{Kb}}$. Produto dos fragmentos amplificados diferenciados por gel de agarose. Os genótipos descritos na figura são: 1 ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$); 2 ($-\alpha^{3,7\text{Kb}}/\alpha\alpha$); 3 ($-\alpha^{3,7\text{Kb}}/\alpha\alpha$); 4 ($-\alpha^{3,7\text{Kb}}/(-\alpha^{3,7\text{Kb}})$).

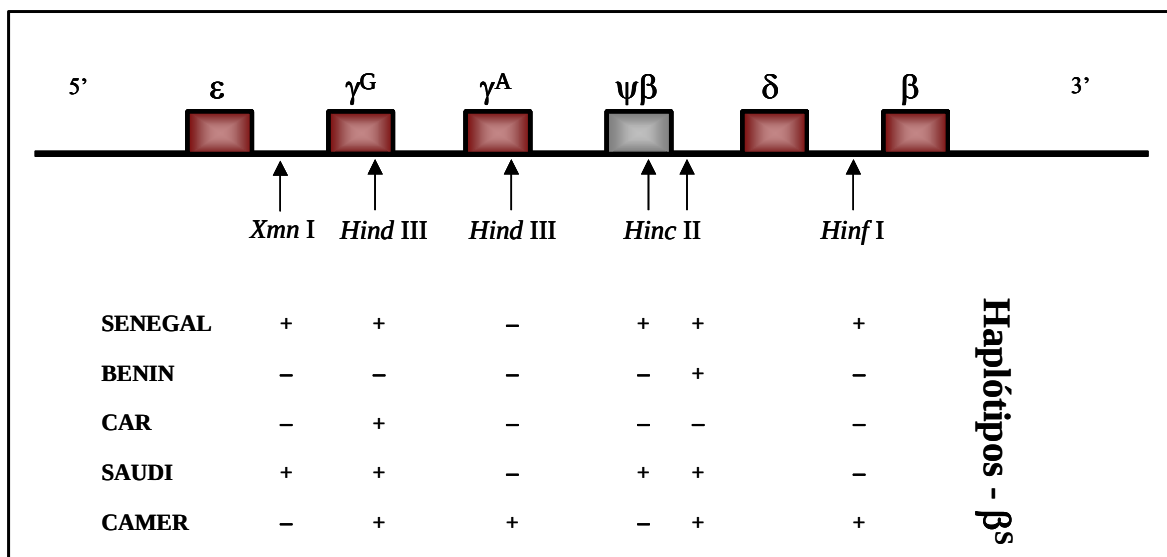


Fonte: Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial – UFPE, 2023.

4.4.4 Determinação dos haplótipos β^S

As análises dos polimorfismos foram realizadas através da amplificação de cada região do DNA que contém os sítios de interesse pelo método da PCR, seguido de análise de restrição. Para os haplótipos β^S foram analisados 6 sítios polimórficos (5' $\gamma\text{G-XmnI}$, $\gamma\text{G-HindIII}$, $\gamma\text{A-HindIII}$, $\psi\beta\text{-HincII}$, 3' $\psi\beta\text{-HincII}$, 5' $\beta\text{-HinfI}$), segundo Sutton e cols. (1989) como mostram a figura 20 e a tabela 3.

Figura 20- Análise dos sítios polimórficos no *Cluster* β . Estudo dos 6 sítios polimórficos no *Cluster* β para a determinação dos haplótipos β^S .



Fonte: Sutton e cols, 1989.

Tabela 3- Primers utilizados para amplificação de regiões do *cluster* β : localização referente ao *cluster* β no cromossomo 11.

Primer	Sequência do Primer	Direção	Posição	Região
H0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	S	33862	5' γ^G
H1	AGGAGCTTATTGATAACTCAGAC	AS	34518	
H2	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	S	36203	γ^G
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	AS	35422	
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	S	40358	γ^A
H4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	AS	41119	
H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	S	46426	$\psi\beta$
H6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	AS	47126	
H7	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	S	49476	3' $\psi\beta$
H8	GGACCCTAACTGATATAACTA	AS	50089	
H9	CTACGCTGACCTCATAAATG	S	60906	5' β
H10	CTAATCTGCAAGAGTGTCT	AS	61291	

S = Sense; AS = Anti-sense.

Fonte: Banco de dados NCBI (ID: U01317).

A composição das reações e condições de amplificação variou dependendo do resultado e estão representadas na tabela 4 e quadro 3, respectivamente.

Tabela 4- Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina β .

Componentes	Volumes (μ l)					
	<i>Xmn</i> I 5' γ^G	<i>Hind</i> III γ^G	<i>Hind</i> III γ^G	<i>Hinc</i> II $\psi\beta$	<i>Hinc</i> II 3' $\psi\beta$	<i>Hinf</i> I 5' β
Tampão (10x)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
MgCl ₂ (50mM)	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,5
dNTP's (10mM)	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,0
Primer 5' (10 μ M)	1,25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Primer 3' (10 μ M)	1,25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Taq DNA Polimerase (5U/ μ l)	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
DNA (200 ng)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
dH ₂ O	37,75	38,0	38,0	38,0	38,0	38,25
Volume Final (μl)	50	50	50	50	50	50

Fonte: A autora (2023).

Quadro 3- Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina β .

Região	Desnaturação inicial		Desnaturação 35 ciclos		Anelamento		Extensão		Extensão Final	
	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
5' γ^G	94	5'	94	45"	60	45"	72	1'30"	72	7'
γ^G	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'
γ^A	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'
$\psi\beta$	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'
3' $\psi\beta$	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'
5' β	94	5'	94	45"	57	45"	72	1'30"	72	7'

Fonte: A autora (2023).

Para confirmação da amplificação, o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta, para posterior análise de restrição.

Para a análise de restrição, o produto da PCR foi digerido a 37°C durante 24 horas, com endonucleases de restrição apropriadas para cada sítio polimórfico. A identificação dos padrões de restrição que determinam os haplótipos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.

Cada amostra foi marcada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de

restrição. Como controle, foi utilizado à amostra de um indivíduo heterozigoto para cada sítio polimórfico. O tamanho dos produtos de amplificação e após clivagem, podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5- Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.

Primers	Enzima	Região	Tamanho Fragmento	Fragmentos Após Clivagem
H0 e H1	<i>XmnI</i>	5'γ ^G	650 pb	450 pb + 200 pb
H2 e H3	<i>HindIII</i>	γ ^G	780 pb	430 pb + 340 pb + 10 pb
H3 e H4	<i>HindIII</i>	γ ^A	760 pb	400 pb + 360 pb
H5 e H6	<i>HincII</i>	ψβ	701 pb	360 pb + 340 pb + 1 pb
H7 e H8	<i>HincII</i>	3'ψβ	590 pb	470 pb + 120 pb
H9 e H10	<i>Hinf I</i>	5'β	380 pb	240 pb + 140 pb

Fonte: A autora (2023).

De acordo com perfil de restrição para as regiões polimórficas do *cluster* da globina β, é possível definir os haplótipos β^S. Pacientes que apresentarem padrão de restrição diferentes do perfil pré-determinado na literatura tem seu haplótipo considerado “Atípico”.

4.5 ANÁLISE DE DADOS

As características clínico-laboratoriais dos indivíduos foram apresentadas de forma descritiva. As frequências genótípicas e alélicas foram calculadas por contagem direta. Para verificar se as frequências estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizado o teste de distribuição de χ^2 . O teste χ^2 ou teste exato de Fisher's (quando aplicável) foi utilizado para comparações entre variáveis categóricas, enquanto que os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para comparações entre as variáveis contínuas. Todos os valores de *P* foram ajustados para os dois lados com nível de significância a 0,05. As análises foram realizadas utilizando o software SPSS Statistics 19.0 (IBM corporation).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS

A Tabela 6 contém os dados da caracterização laboratorial desta população.

Tabela 6- Características laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo.

Variável laboratorial	Mediana	Intervalo
Hb F (%)	9,70	0,8 – 28,5
Contagem de hemácias ($\times 10^{12}$ células/ μ L)	2,1	1,66 – 4,98
Hemoglobina (g/dL)	7,90	6,0 – 11,6
Volume corpuscular médio (fL)	86,95	61 - 103
Hematócrito (%)	22,8	15,0 – 33,0
Contagem de leucócitos ($\times 10^6$ /L)	13,9	2,1 – 24,5
Contagem de plaquetas ($\times 10^9$ /L)	449	49 – 1010
Contagem de reticulócitos (%)	10,6	2,6 – 26,4
Desidrogenase lática (U/L)	829,0	124 – 2401
Bilirrubina total (mg/dL)	1,95	0,26 – 39,0
Bilirrubina indireta (mg/dL)	1,51	0,21 – 11,0

5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E RESULTADOS DO DTC

Do total de pacientes, o grupo caso com DCV foi representado por 47 pacientes (11,6%), 24 tiveram AVCI (6%) e 35 pacientes apresentaram DTC AR (8,7%). 12 pacientes apresentaram os dois eventos com mediana de idade para esse grupo de 4 anos, como mostra a tabela 7.

Tabela 7- Características de sexo e idade do total de pacientes e idade no grupo da doença cerebrovascular.

Características de sexo e idade do total de pacientes e da idade no grupo da DCV	n (%) (n total = 402)
Sexo	
Feminino	193 (48,1%)
Masculino	209 (51,9%)
Idade	
Intervalo (anos)	04 – 20
Mediana de idade (anos)	14
Doença cerebrovascular	
Intervalo de idade (anos)	1 – 12
Mediana de idade (anos)	4

Em relação aos resultados do DTC, 69,3% (257 pacientes) foram normais, 21,3% (79 pacientes) foram condicionantes e 9,4% (35 pacientes) foram de alto risco. Ao analisarmos apenas os pacientes que desenvolveram AVC, aos resultados do DTC, encontramos 2,3% (06 pacientes) com DTC normal, 5,0% (04 pacientes) no grupo com DTC condicionante e 34,28% (12 pacientes) com DTC de alto risco ($p < 0,0001$), como mostra a tabela 8.

Tabela 8- Resultados do Doppler transcraniano e número de casos de AVC por categoria do doppler transcraniano.

Resultado do Doppler Transcraniano			Casos de AVC	
	N	%	N	%
Normal	257	66,2	06	2,3
Condicionante	79	19,6	04	5,0
Alto risco	35	8,7	12	34,2
Inadequado	14	3,6	01	7,1
Inconclusivo	03	0,8	-	
Nunca fez	14	3,7	01	7,0

A categorização do risco do DTC não foi realizada em 31 pacientes: 14 pacientes que não realizaram o exame, 14 pacientes com resultado inadequado e

3 pacientes com DTC inconclusivo.

Dos 402 pacientes, 155 (39,8%) desenvolveram mais que duas crises álgicas ao ano, como mostra a tabela 9. Em relação à STA, do total de 402 pacientes, 39 pacientes (9,8%) apresentaram a complicação.

Com relação às estratégias terapêuticas empregadas para os pacientes, foi observado que dos 47 pacientes com DCV, 24 (51%) não faziam uso da terapia com HU antes do desenvolvimento do desfecho clínico. O regime de transfusão crônico foi iniciado em 96% dos indivíduos pós-DCV. O uso da HU foi feito em 70% dos indivíduos pós-DCV (Tabela suplementar 1).

5.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

Foram genotipados os polimorfismos *ANXA2* (rs11853426) em 367 pacientes, *TEK* (rs489347) em 380 pacientes, *TGFBR3* (rs284875) em 377 pacientes, *ADCY9* (rs2238432) em 379 pacientes e *ENPP1* (rs1044498) em 378 pacientes.

Para todos os o polimorfismo realizados, foram observados MAF > 10%, exceto para o *TGFBR3* (0,07%).

A distribuição genotípica dos SNPs apresentou-se dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$), exceto para os polimorfismos *TGFBR3* (rs284875), *ADCY9* (rs2238432) e *TEK* (rs489347) como mostra a tabela 9.

Tabela 9- Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs.

Gene SNP	Genótipos	Frequência Genotípica (n e %)	Alelos	Frequência Alélica (%)
<i>ANXA2</i> rs11853426	CC	102 (27,8%)	C T	0,53 0,47
	CT	185 (50,7%)		
	TT	79 (21,5%)		
<i>TEK</i> rs489347	CC	226 (59,5%)	C G	0,75 0,25
	CG	122 (32,4%)		
	GG	31 (8,2%)		
<i>TGFBR3</i> rs284875	TT	332 (88,3%)	T C	0,93 0,07
	TC	39 (10,3%)		
	CC	5 (1,3%)		
<i>ADCY9</i> rs2238432	GA	102 (26,9%)	G A	0,87 0,13
	GG	276 (73,1%)		
<i>ENPP1</i> rs1044498	TT	132 (34,9%)	T G	0,57 0,43
	TG	170 (45,2%)		
	GG	75 (19,8%)		

5.4 GENOTIPAGEM DA ALFA TALASSEMIA E DE HAPLÓTIPOS β^S GLOBINA

A deleção α -3,7kb foi realizada em 350 pacientes e encontrada em 20,6% (72 pacientes), como mostra a tabela 10. 48 amostras não foram analisadas no grupo não DVC e 4 no grupo DCV.

Os haplótipos β^S foram agrupados em CAR/CAR e não CAR/CAR uma vez que a incidência do haplótipo CAR/CAR é fortemente predominante em nossa região (Hatzlhofer BLD et al. 2021). Foram realizadas 334 genotipagens dos haplótipos. O haplótipo CAR/CAR foi encontrado em 57,0% dos pacientes. A frequência do alelo CAR foi de 75%, do alelo Benin de 16% e do haplótipo atípico (ATP) de 7,0%. Os haplótipos Árabe indiano, Camarões e Sengal tiveram frequência menor que 1%. Estes dados estão descritos na tabela 10.

Tabela 10- Frequência dos haplótipos β s e da alfa talassemia.

Modulador Genético	N	(%)
Deleção -α3,7Kb (N = 351)		
- α /- α	08	2,3
- α / $\alpha\alpha$	64	18,2
$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	278	79,5
Haplótipos βs (N = 334)		
CAR/CAR	190	57,0
CAR/BEN	78	23,3
CAR/ATP	36	10,7
BEN/BEN	11	3,3
BEN/ATP	10	3,0
CAR/ARB	3	0,9
CAR/CAM	2	0,6
BEN/CAM	1	0,3
BEN/ARB	1	0,3
CAR/SEN	1	0,3
SEN/ATP	1	0,3

CAR (República Central Africana); BEN (Benin); ATP (Atípico); CAM (Camarões); ARB (Árabe-Indiano), SEN (Senegal).

5.5. COMPARAÇÃO DOS DADOS DO GRUPO CASO E GRUPO CONTROLE

A tabela 11 reúne as características clínico-laboratoriais e de genotipagem dos polimorfismos, proporcionando a comparação de acordo com o status da DCV.

Podemos observar que níveis maiores de HbF tiveram impacto significativo na proteção contra o DCV ($p < 0,001$), assim como os níveis mais altos de hemoglobina ($p = 0,005$). Apesar de apresentar uma associação estatística limítrofe, maiores níveis de leucócitos foram associados com risco de DCV ($p = 0,055$).

Para as análises de associação com as variáveis genéticas foram aplicados os modelos de herança genética recessivo, dominante e codominante. Independente do modelo empregado, não foram observadas relação de

significância estatística dos polimorfismos genéticos, haplótipos ou até mesmo da mutação $\alpha^{-3,7\text{kb}}$ com a desfecho clínico ($p > 0,05$).

Além disso foi observado que a terapia com HU influenciou no risco de desenvolvimento da DCV, onde pacientes em uso da droga tinham uma menor frequência do desfecho clínico ($p = 0,037$).

Tabela 11- Características dos pacientes com anemia falciforme de acordo com o status da doença cerebrovascular.

Variáveis	Total de pacientes		DCV		Não DCV		P-value
	No.	%	No.	%	No.	%	
Sexo							
Feminino	193	48,1	26	55,3	167	47,0	0,351
Masculino	209	51,9	21	44,7	188	53,0	
Idade, mediana	14		15		14		0,124
Intervalo	(4-20)		(6-20)		(4-20)		
Hb F (%), mediana	9,70		6,20		10,20		<0,0001*
Intervalo	(0,80-28,50)		(1,20-11,20)		(0,80-28,50)		
Hb (g/dL), mediana	7,90		7,60		8,00		0,005*
Intervalo	(6,00-11,60)		(6,20-10,00)		(6,00-11,60)		
VCM (fL), mediana	86,95		86,10		87,00		0,930
Intervalo	(61-103)		(72-100)		(61-103)		
WBC ($\times 10^3/L$), mediana	13,90		15,35		13,85		0,055
Intervalo	(2.10-24,53)		(9.7-21.50)		(2.10-24.53)		
Pla α ($\times 10^3/L$), mediana	449,0		449,0		448		0,543
Intervalo	(49,00-1010)		(228-748)		(49-1010)		
Ret (%), mediana	10,60		9,60		10,60		0,647
Intervalo	(2,60-26,40)		(4,20-25,30)		(2,60-26,40)		
DHL (U/L), mediana	829,00		711,5		830		0,620
Intervalo	(124-2401)		(371-2401)		(124-2277)		
BI (mg/dL), mediana	1,51		1,35		1,51		0,653
Intervalo	(0,21-11,00)		(0,35-6,92)		(0,21-11,00)		
CA/ano ¹							
0-2	235	60,2	33	71,1	202	58,7	
2-5	104	26,7	9	20	95	27,6	0,235
>5	51	13,1	4	8,9	47	13,7	
Não analisados	12						
Síndrome torácica aguda							
Sim	39	9,8	01	2,2	38	10,8	0,067
Não	359	90,2	46	97,8	313	89,2	
Hidroxiureia**							
Sim	251	63,1	23	48,9	228	65,0	0,037*
Não	147	36,9	24	51,1	123	35,0	
Não analisados	04				04		
Haplótipo							
Não CAR/CAR	144	43,1	15	34,6	129	44,5	0,253
CAR/CAR	190	56,9	29	65,9	161	55,5	
Não analisados	68						
α – Thal							
Normal	278	79,4	38	88,4	240	78,2	0,158
Mutado	72	20,6	05	11,6	67	21,8	
Não analisados	52		04		48		
ANXA2 rs11853426							
CC	102	27,8	13	28,9	89	27,6	0,370

CT	185	50,7	19	42,2	166	51,9	
TT	79	21,5	13	28,9	66	20,5	
Não analisados	36		02		34		
ADCY9 rs2238432							
GG	276	73,1	38	80,9	238	72,0	0,223
GA	102	26,9	9	19,1	93	28,0	
Não analisados	24				24		
TGFBR3 rs284875							
TT	332	88,3	38	82,6	294	89,1	0,436
TC	39	10,4	7	15,2	32	9,7	
CC	05	1,3	01	2,2	04	1,2	
Não analisados	26		01		25		
TEK rs489347							
CC	226	59,56	26	55,3	200	60,2	0,606
CG	122	32,2	18	38,3	104	31,3	
GG	31	8,2	3	6,5	28	8,4	
Não analisados	23				23		
ENPP1 rs1044498							
TT	132	35,0	16	34,8	116	35,0	0,941
TG	170	45,1	20	43,5	150	45,3	
GG	75	19,9	10	21,7	65	19,6	
Não analisados	25		01		24		

Abreviação: Hb F- Hemoglobina Fetal; BI-bilirrubina indireta; LDH-Desidrogenase láctica; WBC- Contagem de glóbulos brancos; Plaq- Plaquetas; Ret- Reticulócitos; CA-Crise alérgica.

¹Nós só consideramos o números de CAs documentadas no último ano (2021)

*Indica diferença estatística significativa

** Para os pacientes do grupo DCV, foram consideradas as informação de terapia da HU antes do desenvolvimento do desfecho.

6. DISCUSSÃO

O acidente vascular cerebral é uma complicação grave da anemia falciforme, com incidência de aproximadamente 11% até os 20 anos de idade, trazendo grande impacto na qualidade de vida destes pacientes. Por isso se faz necessária a identificação precoce daqueles indivíduos que apresentam maior risco de AVC, para que o tratamento de prevenção possa ser realizado (DeBaun MR, 2020).

A partir do estudo STOP, os resultados de diminuição do risco do AVC com a prevenção, através da realização do DTC, têm sido reproduzidos pelo mundo afora (Adams RJ et al, 1998, Lobo et al, 2010, DeBaun MR, 2020). O *guideline* brasileiro recomenda a realização do DTC para a prevenção primária do AVC entre 2 a 16 anos de idade para portadores de AF (Lobo et al, 2010). Recentemente, a Sociedade Americana de Hematologia confeccionou um *guideline* de prevenção, diagnóstico e tratamento da DCV na AF, fazendo considerações em relação às peculiaridades destas medidas em países em desenvolvimento e reafirmaram a importância da realização do DTC na prevenção do AVCI (DeBaun MR et al, 2020). No entanto, esta ferramenta apresenta suas limitações, uma delas é a baixa especificidade, promovendo terapias como RTC para crianças que não terão AVC, causando exposição desnecessárias aos efeitos adversos do tratamento. Diante disto, outros métodos de identificação do risco do AVC na DF se faz necessário.

Algumas características clínico-laboratoriais da AF já vêm sendo associadas aos risco de DCV (Belisario et al, 2018, Hatzlhofer et al. 2021; Reggiane et al. 2023). Estudos em gêmeos portadores desta doença, mostraram a relação do risco do DTC anormal e do AVC, com importante relação do componente genético com o risco da doença cerebrovascular (Driscoll et al, 2003, Kwiatkowski et al, 2003).

Neste estudo do tipo transversal e retrospectivo avaliamos a existência de associação de moduladores genéticos e clínico-laboratoriais com o risco da doença cerebrovascular em população pediátrica, com mediana de idade de 14 anos, num total de 402 pacientes portadores de AF, acompanhadas em centro acadêmico.

Não foram observadas relação de significância estatística dos polimorfismos genéticos *ANXA2* (rs11853426), *TEK* (rs489347), *TGFBR3* (rs284875), *ADCY9* (rs2238432) e *ENPP1* (rs1044498), com o risco da DCV,

diferentemente do que alguns autores encontraram anteriormente (Sebastian et al. 2005; Flanagan et al, 2011).

Em alguns estudos nos quais alguns polimorfismos mostraram associação de risco de AVC, divergências foram evidenciadas, como por exemplo em relação à variante no gene *GOLGB1*, em que Flanagan e colaboradores (2013) encontram associação de proteção, enquanto que, na população estudada por Belisário e colaboradores (2015), este resultado não foi confirmado. Já, em relação ao gene *ENPP1*, a variante *ENPP1* Q173 (Flanagan et al. 2013) foi associada à proteção contra o risco de AVC, enquanto que, no estudo de Belisário e colaboradores (2015) a variante *ENPP1* K173 é que foi associada ao aumento do risco, como sinalizado no quadro 2.

Não foram encontradas relação de significância estatística com os haplótipos estudados (CAR, BEN, SEN, CAM, ARB e ATP) e o risco da DCV. Em nossa população o haplótipo CAR/CAR foi o mais frequente (57%) e a frequência do alelo CAR de 75%. Alguns estudos brasileiros mostram a predominância deste haplótipo em nosso país, com uma frequência que varia entre 41 a 67% (Zago et al.1992; Figueiredo et al. 1996; Cardoso and Guerreiro JF. 2010; Silva LB and Gonçalves RP. 2010; Filho ILS, et al. 2010; Cabral CHK et al. 2011; Camilo-Araújo RF et al. 2014; Da Silva MAL, et al. 2014; Shimauti ELT et al. 2015; Alves AC et al. 2020). Nossos resultados mostraram que o estado de Pernambuco apresenta a maior frequência alélica do haplótipo CAR da β S-globina no Brasil (75,1%). Na maioria dos estados brasileiros há alta prevalência do genótipo heterozigoto CAR/Benin (Zago et al.1992; Figueiredo et al. 1996; Cardoso and Guerreiro JF. 2010; Silva LB and Gonçalves RP. 2010; Filho ILS, et al. 2010; Cabral CHK et al. 2011; Camilo-Araújo RF et al. 2014; Da Silva MAL, et al. 2014; Shimauti ELT et al. 2015; Alves AC et al. 2020), mas o genótipo mais frequente encontrado em nosso estudo foi o haplótipo homozigoto CAR/CAR. Os haplótipos ARB e SEN, tidos como mais favoráveis (Steinberg MH. 2020b), tiveram incidência de <1%.

Nossos resultados apresentaram como associações de proteção à DCV níveis mais altos de Hb total ($p < 0,005$), de HbF ($p < 0,001$) e uso da HU ($p < 0,037$). De forma consistente estas características são considerados, na literatura, como fatores protetores contra a DCV (Belisario et al, 2018; MacGann et al. 2019; Henry ER et al. 2020; Hatzlhofer et al. 2021; Reggiane et al. 2023).

A hemoglobina fetal tem poderosa propriedade antipolimerização, uma vez

que suas subunidades de γ -globina formam tetrâmeros híbridos mistos de duas cadeias de α -globina, com uma cadeia de γ -globina e uma cadeia de β^S -globina e, por serem mais solúveis, não sofrem polimerização (Eaton and Bunn HF, 2017, Rees et al, 2018; Williams and Thein, 2018, Henry ER et al. 2020) Lettre (2008), Cardoso (2014) e seus colaboradores demonstraram a influência das variantes genéticas relacionadas à HbF no impacto dos fenótipos da doença. Mais recentemente, Sommet e colaboradores (2016), em estudo longitudinal prospectivo, observou o papel protetor da HbF contra a DCV (HR: 0.68; 95% CI: 0.48-0.96). Uma vez que ocorre menor polimerização em consequência de maiores níveis de HbF, há diminuição da hemólise intravascular, protegendo o endotélio da lesão causada pelas espécies reativas de oxigênio e da depleção do NO, provocada pelos produtos da hemólise. A menor taxa de hemólise tem como consequência maiores valores da hemoglobina total. Ataga e colaboradores (2020) observaram que o aumento de apenas 1g/dl da Hb total pode conferir uma redução de 41% na redução do AVC. Este achado é também explicado pelo mecanismo fisiopatológico subjacente da lesão cerebrovascular isquêmica na AF, onde a gravidade da anemia está associada ao aumento do fluxo sanguíneo cerebral, diminuição da reserva compensatória e maior risco do AVC durante períodos de estresse, quando a oferta e a demanda de oxigênio cerebral encontram-se em desequilíbrio (Debaun et al. 2012).

A hidroxiureia é, atualmente, o mais poderoso modulador da AF (MacGann et al. 2019; Montalembert et al. 2021; Wang W et al. 2023). Seus principais efeitos são de indução da produção de HbF através do estresse eritropoiético, aumento do NO e diminuição da adesão celular levando à redução de crises algicas, hospitalização e necessidade transfusional. Estudos comprovam a eficácia da hidroxiuréia na diminuição das velocidades do DTC (Hankins JS et al. 2015, Adegoke SA et al. 2018), sendo útil e efetivo na prevenção de AVCI, particularmente em países em desenvolvimento, como ferramenta terapêutica de grande importância, onde a disponibilidade do uso de RTC é geralmente restrita (Ballas SK et al. 2020; DeBaun MR et al. 2020).

Em nossa população, níveis maiores de HbF, cujo valor da mediana foi 9,7% (0,8-28,5%), foram associados à proteção contra a DCV. Nossa população apresenta preponderantemente o haplótipo CAR, considerado o de maior gravidade. Estudos mostram que, entre as possíveis causas de níveis

excepcionalmente elevados de HbF, estão deleções ou substituições de base única no agrupamento do gene *HBB* e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes *BCL11A* e *MYB* (*HMIP-2*) que codificam repressores da expressão do gene HbF (Uda M et al. 2008; Friedrisch JR et al. 2018). Leonardo e colaboradores (2016) demonstraram que no Brasil, como em outras partes do mundo, variantes comuns de *HMIP-2* e *BCL11A* aumentam os níveis de HbF em pacientes com AF. Contudo, esses efeitos foram mais perceptíveis em pacientes brasileiros portadores de AF, sugerindo a influência da miscigenação genética, uma vez que a mutação falciforme nos nossos pacientes está inserida num contexto genético com grande proporção de descendentes europeus, transportando alelos promotores de HbF em alta frequência. Ainda no mesmo estudo, alelos que aumentam a HbF nos loci estudados foram associados a uma redução significativa nas complicações relacionadas à falciforme, especialmente acidente vascular cerebral (Leonardo et al. 2016; Steinberg MH. 2020).

A coherança da alfa talassemia não apresentou associação com a DCV em nossos pacientes, apesar de observarmos uma quantidade consideravelmente menor da existência da coherança da talassemia no grupo caso (11,6% x 21,8%). A prevalência desta deleção em nosso estudo de 20,5% está em concordância com outras previamente relatadas em estudos anteriores (Neonato MG et al. 2000; Adorno EV et al. 2008; Uda M et al. 2008, Belisário et al. 2010, Hatzlhofer BLD et al. 2020). Ataga e colaboradores (2020) observou que em pacientes com AF, a coexistência de talassemia alfa produziu uma redução relativa do risco de 0,44 para AVC, com uma análise multivariada mostrando que o efeito protetor da talassemia alfa se deve em grande parte à melhora na concentração de hemoglobina; a talassemia alfa não foi um preditor significativo de acidente vascular cerebral após ajuste para concentração de hemoglobina (Ataga et al. 2020).

Diferentemente de estudos anteriores, como os relatados por Meier (2014, 2016), Belisário (2016; 2018), Sommet (2016) e Debaun (2020) e seu colaboradores, nos quais a contagem de reticulócitos se mostrou o preditor mais poderoso de AVCI e DTC AR, nosso estudo não mostrou associação ($p=0,62$), assim como também não encontramos associação com a leucocitose, também considerada fator de risco com DCV pelos mesmos autores acima citados.

Não encontramos associação de risco de DCV em relação à crise algica e STA, duas complicações mais associadas ao fenótipo da vasclusão. A STA

apresenta associação de risco aumentado com o AVC principalmente por causa da hipóxia secundária à doença pulmonar (Ojewunmi et al. 2018; Colombatti R et al. 2018) Uma das principais indicações do uso da hidroxiureia é para pacientes que apresentam crises álgicas recorrentes e STA, com o objetivo de induzir a ascensão da HbF (Ballas SK et al. 2020). Nossos dados mostraram que o uso de HU e níveis altos de HbF apresentaram associação com a proteção do AVC.

Dados do nosso estudo mostram que a mediana da idade do evento da DCV foi de 4 anos de idade, sendo que 1 paciente apresentou AVC antes dos dois anos de idade. O DTC é realizado para pacientes entre os 2 aos 16 anos de idade, não possibilitando conhecer, através dele, o risco do AVC em idades que estão fora desta faixa etária, evidenciando uma das limitações desta ferramenta prognóstica. Em nosso estudo houve a ocorrência de AVC em 2,3% do pacientes com DTC normal, 5% com condicionante e 7,1% dos exames inadequados, evidenciando também suas limitações de sensibilidade.

Conforme documento do Ministério da Saúde de 2020 (Sickle Cell Disease: transcranial doppler coverage in Brazil from 2018 to 2020) a cobertura do DTC no ano de 2018 em Pernambuco foi de 115,38% e em 2019 de 85,71%, ganhando posição de destaque no cenário nacional. No entanto, nos anos de 2020 a 2021 estes índices caíram de forma importante devido à pandemia causada pelos SARS-COV-19 e em 2022 a realização deste exame foi interrompida pela quebra do aparelho, sendo reiniciada em meados do ano corrente. AF. A avaliação sistemática por ressonância magnética não foi realizada em nossos pacientes, não sendo possível considerar os infartos silenciosos na análise, que é um importante fator de risco para o AVC em crianças com AF (DeBaun MR et al. 2020), mesmo porque, esta prática oneraria de forma importante o estudo. As limitações do DTC, já citadas em literatura (Lagunju IA et al. 2013; Salama K et al. 2020; Phillips SM, et al. 2021; DeBaun MR et al. 2020) levam à necessidade da associação de outras ferramentas que possam identificar precocemente o risco do AVC dos pacientes com AF.

Buscar ferramentas genéticas, utilizando polimorfismos em genes envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos da patogênese da DCV, como genes da angiogênese, inflamação, regulação do tônus vascular, proliferação celular, apoptose e coagulação tem sido um dos objetivos de otimizar a detecção precoce do risco de AVC em pacientes com AF, embora seja uma ferramenta de alto custo, principalmente em países onde até mesmo a implementação do rastreamento de TCD

não seja viável (Lagunju et al. 2014, Belisario AR. 2016), representando um desafio adicional para a comunidade científica na identificação de ferramentas custo-efetivas que possam prever o AVC em crianças com doença falciforme em todo o mundo.

Uma possível razão para a falha na replicação de alguns resultados de polimorfismos é que a genética subjacente da vasculopatia cerebral em crianças com AF seja baseada em múltiplos genes com efeitos menores e indireto no risco de AVC (Amlie-Lefond C. Et al. 2018).

O Brasil apresenta níveis excepcionais de mistura genética (da Silva et al, 2011; Coelho et al, 2015), e isso também se aplica à população de portadores de AF, fator que pode explicar nossos resultados serem distintos da literatura, cujas populações apresentam background genético diferente.

Futuros estudos de polimorfismos em todo o genoma nos permitirão conhecer como complexos mecanismos genéticos influenciam no risco de AVC na AF. Até lá, é de extrema importância identificar um score clínico- laboratorial de risco para o AVC, que seja validado em coortes independentes. Além disso, o uso da hidroxiuréia em idade cada vez mais precoce (WangW et al. 2023), assim como a possibilidade do efeito de novas terapias com diferentes mecanismos de ação (Ballas SK.2020; Blair HA. 2020; Herity LB et al. 2021; Engel ER et al. 2020) na fisiopatologia do AVC, provavelmente reduzirá o risco desta complicação tão grave em portadores de AF.

7. CONCLUSÕES

Os polimorfismos ANXA2 (rs11853426), TEK (rs489347), TGFBR3 (rs284875), ADCY9 (rs2238432), ENPP1 (rs1044498), a deleção da talassemia alfa (- α 3.7Kb), os haplótipos da β S globina não apresentaram associação com o risco do AVC em nossa coorte pediátrica.

Nossos resultados apresentaram como associações de proteção à DCV níveis mais altos de Hb total ($p < 0,005$), de HbF ($p < 0,001$) e uso da HU ($p < 0,037$).

Nosso resultado divergiu dos resultados de estudos semelhantes na literatura, possivelmente pela influência do background genético dos pacientes em nossa população, que pode alterar a ação dos modificadores genéticos da AF.

Futuros estudos de polimorfismos em todo o genoma serão necessários para permitir conhecer como os complexos mecanismos genéticos influenciam no risco de AVC na AF.

8. REFERÊNCIAS

- Abboud MR, Cure J, Granger S, Gallagher D, Hsu L, Wang W, Woods G, Berman B, Brambilla D, Pegelow C et al. (2004) Magnetic resonance angiography in children with sickle cell disease and abnormal transcranial Doppler ultrasonography finding enrolled in the STOP study. *Blood* 103:2822-2826.
- Abboud MR, Yim E, Musallam KM, Adams RJ. (2011) Discontinuing prophylactic transfusions increases the risk of silent brain infarction in children with sickle cell disease: data from STOP II. *Blood* Jul 28;118(4):894-8. PubMed PMID: 21633086. Pub med Central PMCID:3148169. E pub 2011/06/03. eng.
- Accioly J (1947) Anemia Falciforme – apresentação de um caso com infantilismo. *Tertúlias Acadêmicas. Arquivo da Universidade da Bahia - Faculdade de Medicina da Bahia*, 42p.
- Adams RJ, Kutlar A, McKie V, Carl E, Nichols FT, Liu JC, McKie K, Clary A (1994) Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. *Am J Hematol* 45(4):279-82.
- Adams R, Mc Kie V, Nichols F, Carl E, Zhang DL, Mckie K, Figueroa R, Litaker M, Thompson W, Hess D (1992) The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med* 326:605-610.
- Adams RJ, McKie VC, Carl EM, Nichols FT, Perry R, Brock K, McKie K, Figueroa R, Litaker M, Weiner S, Brambilla D (1997) Long-term stroke risk in children with sickle cell disease screened with transcranial Doppler. *Ann Neurol* 42(5): 699–704.
- Adams RJ, Mc Kie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, Abboud M, Gallagher D, Kutlar A, Nichols FT, Bonds DR, Barmbilla D (1998) Prevention of a first stroke by transfusion in children with sickle cell anemia and abnormal result on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med* 339:5-11.
- Adams RJ, McKie VC, Brambilla D, Carl E, Gallagher D, Nichols FT, Roach S, Abboud M, Berman B, Driscoll C et al. (1998) Stroke prevention trial in sickle cell anemia. *Control Clin Trials* Feb;19(1):110-29.
- Adams RJ, McKie VC, Carl EM, Nichols FT, Perry R, Brock K, Mckie K, Figueroa R, Litaker M, Weiner S, Brambilla D et al. (1997) Long-term stroke risk in children with sickle cell disease screened with transcranial Doppler. *Ann Neurol* Nov;42(5):699-704.
- Adams RJ, Brambilla DJ, Granger S, Gallagher D, Vichinsky E, Abboud MR,

- Pegelow CH, Woods G, Rohde EM, Nichols FT et al. (2004) Stroke and conversion to high risk in children 90 screened with transcranial Doppler ultrasound during the STOP study. *Blood*. 15;103(10):3689-94.
- Adams RJ (2005) TCD in sickle cell disease: an important and useful test, *Pediatr. Radiol*. 35 (2005) 229–234.
- Adams RJ (2007) Big strokes in small persons. *Arch Neurol* Nov;64(11):1567-74.
- Adegoke SA, Macedo-Campos RS, Braga JAP, Figueiredo MS, Silva GS (2018) Changes in Transcranial Doppler Flow Velocities in Children with Sickle Cell Disease: The Impact of Hydroxyurea Therapy. *J Stroke Cerebrovasc Dis* Feb;27(2):425-431.
- Adekile A, 2021. The genetic and clinical significance of fetal hemoglobin expression in sickle cell disease. *Med Princ Pract* 30(3):201-211.
- Adorno EV, Zanette Â, Lyra I, Seixas MO, Reis MG, Gonçalves MS (2008) Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. *Genet Mol Biol* 31:621–625.
- Ahmed MH, Ghatge MS, Safo MK. Subcell (2020) Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Biochem* 94:345-382.
- Akinsheye, I, Klings, ES (2010) Sickle cell anemia and vascular dysfunction: The nitric oxide connection. *J. Cell. Physiol*. 224, 620–625.
- Alakbarzade V, Maduakor C, Khan U, Khandanpour N, Rhodes E, Pereira AC (2023) Cerebrovascular disease in sickle cell disease. *Pract Neurol* Apr;23(2):131-138.
- Ali SA. (1970) Milder variant of sickle-cell disease in Arabs in Kuwait associated with unusually high level of foetal haemoglobin. *Br J Haematol* 19(5): 613–9.
- Ali SB, Moosang M, King L, Knight-Madden J, Reid M (2011) Stroke recurrence in children with sickle cell disease treated with hydroxyurea following first clinical stroke. *Am J Hematol* 86(10): 846–850.
- Allali S, Maciel TT, Hermine O, Montalembert M (2020) Innate immune cells, major protagonists of sickle cell disease pathophysiology. *Haematologica*. 105(2):273–283.
- Alves AC, da Silva VAL, Dos Santos A, Serra MB, Marques FA, Cruz SMP, Barroso WA, de Oliveira RAG (2020) Sickle cell anemia in the state of Maranhão: a haplotype study. *Ann Hematol* 99:1225–1230.
- Amlie-Lefond C, Flanagan J, Kanter J, Dobyns WB (2018) The Genetic Landscape

- of Cerebral Steno-Occlusive Arteriopathy and Stroke in Sickle Cell Anemia. *J Stroke Cerebrovasc Dis* Nov;27(11):2897-2904.
- Araújo ADS, Silva Pinto AC, Lobo CLC, Figueiredo MS, Menosi Gualandro SF, Olalla Saad ST, Cancado RD (2023) Novel Insights into the Pathophysiology and Treatment of Sickle Cell Disease. *Hemoglobin* Nov;47(2):71-79.
- Arends A, Alvarez M, Velázquez D, Bravo M, Salazar R, Guevara JM, Castillo O (2000) Determination of b-globin gene cluster haplotypes and prevalence of a-thalassemia in sickle cell anemia patients in Venezuela. *Am J Hematol* 64:87–90.
- Arkuszewski M, Krejza J, Chen R, Ichord R, Kwiatkowski JL, Bilello M, Zimmerman R, Ohne-Frempong K, Melhem E (2014) Sick cell anemia: intracranial stenosis and silent cerebral infarcts in children with low risk of stroke. *Adv Med Sci* Mar;59(1):108-13.
- Arnold SD, Brazauskas R, He N, Li Y, Aplenc R, Jin Z, Hall M, Atsuta Y, Dalal J, Hahn T et al (2017) Clinical risks and health care utilization of hematopoietic cell transplantation for sickle cell disease in the USA using merged data bases. *Haematologica* 102:1823-1832.
- Ashouri R, Fangman M, Burris A, Ezenwa MO, Wilkie DJ, Doré S (2021) Critical role of hemopexin mediated cytoprotection in the pathophysiology of sickle cell disease. *Int. J. Mol. Sci* 22, 6408.
- Asnani MR, Knight Madden J, Reid M, Greene LG, Lyew-Ayee P (2017) Socio-environmental exposure and health outcomes among persons with sickle cell disease. *PLoS One* 12(4):e0175260.
- Ataga KI, Kutlar A, Kanter J, Liles D, Cancado R, Friedrisch J, Juthrie T, Knight-Madden J, Alvarez OA, Gordeuk VR et al (2017) Crizanlizumab for the prevention of pain crises in sickle cell disease. *N Engl J Med* 376(5):429–439.
- Ataga KI, Gordeuk VR, Agodoa I, Colby JA, Gittings K, Allen IE (2020) Low hemoglobin increases risk for cerebrovascular disease, kidney disease, pulmonary vasculopathy, and mortality in sickle cell disease: a systematic literature review and meta-analysis. *PLoS One*.15(4): e0229959
- Azevêdo ES (1973) Historical Note on Inheritance of Sick Cell Anemia. *Am J Hum Genet* 25: 457-458.
- Bacci S, Ludovico O, Prudente S, Zhang YY, Di Paola R, Mangiacotti D, Rauseo A, Nolan D, Duffy J, Fini G et al. (2005) The K121Q polymorphism of the

ENPP1/PC-1 gene is associated with insulin resistance/atherogenic phenotypes, including earlier onset of type 2 diabetes and myocardial infarction. *Diabetes* Oct;54(10):3021-5.

- Bacci, S, Di Paola R, Menzaghi C, Di Fulvio P, Di Silvestre S, Pellegrini F, Baratta R, Marucci A, Mastroianno S, Fini G, Formoso G et al. (2009) ENPP1 Q121 variant, increased pulse pressure and reduced insulin signaling, and nitric oxide synthase activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vascr Biol* Oct;29(10):1678-83.
- Bailey L, Kuroyanagi Y, Franco-Penteado CF, Conran N, Costa FF, Ausenda S, Cappellini MD and Ikuta T (2007) Expression of the γ -globin gene is sustained by the cAMP-dependent pathway in β -thalassaemia. *Br J Haematol* 138:382–395.
- Baldwin, C, VG Nolan, DF Wyszynski, Q L Ma, P Sebastiani, Embury SH, Bisdee A, Farrell J, Farrer L, Steinberg MH (2005) Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. *Blood* 106: 372-375.
- Ballas SK, Lusardi M (2005) Hospital readmission for adult acute sickle cell painful episodes: frequency, etiology, and prognostic significance. *Am J Hematol* 79:17-25.
- Ballas SK, Lieff S, Benjamin LJ, Dampier CD, Heeney MM, Hoppe C, Johnson CS, Rogers ZR, Smith-Whitley K, Wang WC et al. (2010) Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *Am J Hematol* 85:6–13. doi: 10.1002/ajh.21550.
- Ballas SK (2018) Sickle cell disease: Classification of clinical complications and approaches to preventive and therapeutic management. *Clin Hemorheol Microcirc* 68(23):105-128.
- Ballas SK, (2020) The evolving Pharmacotherapeutic landscape for the treatment of sickle cell disease, *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 12, e2020010.
- Balkaran B, Char G, Morris JS, Thomas PW, Serjeant BE, Serjeant GR (1992) Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. *J Pediatr.* Mar;120(3):360-6.
- Barazia A, Li J, Kim K, Shabrani N, Cho J (2015) Hydroxyurea with AKT2 inhibition decreases vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. *Blood* 126(22):2511–2517.

- Belisario AR, Rodrigues CV, Martins ML, Silva CM, Viana MB (2010) Coinheritance of alpha-thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. *Hemoglobin* 34(6):516-529.
- Belisario AR, Martins ML, Brito AMS, Rodriguez CV, Silva CM, Viana MB (2010) B-Globin gene cluster haplotypes in a cohort of 221 children with sickle cell anemia or S β -thalassemia and their association with clinical and hematological features. *Acta Haematol* 124:162–170.
- Belisario AR, Sales RR, Toledo NE, Velloso-Rodrigues C, Silva CM, Viana MB (2015) Association between ENPP1K173Q and stroke in a new born cohort f395 Brazilian children with sickle cell anemia. *Blood* 126:1259-1260.
- Belisário A R, Sales RR, Toledo NE, Muniz MBSR, Velloso-Rodrigues C, Silva CM, Viana MB (2016) Reticulocyte count is the most important predictor of acute cerebral ischemia and high-risk transcranial Doppler in a newborn cohort of 395 children with sickle cell anemia. *Annals of Hematology*, 95(11), 1869–1880.
- Belisário AR, Silva CM, Velloso-Rodrigues C, Viana MB (2018) Genetic, laboratory and clinical risk factors in the development of overt ischemic stroke in children with sickle cell disease. *Hematol Transfus Cell Ther* Apr Jun;40(2):166-181.
- Belli SI, Goding JW (1994) Biochemical Characterization of Human PC- 1, an Enzyme Possessing Alkaline Phosphodiesterase I and Nucleotide Pyrophosphatase Activities. *European Journal of Biochemistry* Dec 1;226(2):433–443.
- Bernaudin F, Verlhac S, Coic L, Lesprit E, Brugieres P, Reinert P (2005) Long-term follow-up of pediatric sickle cell disease patients with abnormal high velocities on transcranial Doppler. *Pediatr Radiol* Mar;35(3):242-8.
- Bernaudin F, Verlhac S, Chevret S, Torres M, Coic L, Arnaud C, Kadem A, Hau I, Neonato MG, Delacourt C (2008) G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. *Blood* 112(10):4314-4317.
- Bernaudin F, Verlhac S, Arnaud C, Kamdem A, Chevret S, Hau I, Coic L, Leveillé E, Lemarchand E, Lesprit E et al. (2011) Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. *Blood* Jan 27;117(4):1130-40.

- Bernaudin F, Verlhac S, Arnaud C, Kamdem A, Vasile M, Kasbi F, Hau I, Madhi F, Fourmaux C, Biscardi S et al. (2015) Chronic and acute anemia and extracranial internal carotid stenosis are risk factors for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia. *Blood* 125(10):1653-61.
- Bernaudin F, Verlhac S, Arnaud C, Kamdem A, Hau I, Leveillé E, Vasil M, Kasbi F, Madhi F, Fourmaux C et al. (2016) Long-term treatment follow-up of children with sickle cell disease monitored with abnormal transcranial Doppler velocities. *Blood* 127:1814-1822.
- Bernaudin F, Arnaud C, Kamdem A, Hau I, Lelong F, Epauld R, Pondarré C and Pissard S (2018) Biological impact of α genes, β haplotypes, and G6PD activity in sickle cell anemia at baseline and with hydroxyurea. *Blood Adv* 2:626–637.
- Bernaudin F (2019) Why, who, when, and how? Rationale for considering allogeneic stem cell transplantation in children with sickle cell disease. *J Clin Med* 8(10):1523.
- Benaud C, Le Dez G, Mironov S, Galli F, Reboutier D, Prigent C (2015) Annexin A2 is required for the early steps of cytokinesis. *EMBO Rep* 16(4):481-9.
- Benaud C, Prigent C (2016) Annexin A2: A new player in mitosis. *Cell Cycle* 15: 9-10.
- Bertles JF, Rabinowitz R, Dobler J (1970) Hemoglobin interaction: modification of solid phase composition in the sickling phenomenon. *Science* 169(3943): 375–7.
- Bezerra MAC, Santos MNN, Araújo AS, Gomes YM, Abath FGC, Bandeira FMGC (2007) Molecular variations linked to the grouping of beta- and alpha-globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the state of Pernambuco, Brazil. *Hemoglobin* 31(1):83–8.
- Bharadwaj A, Bydoun M, Holloway R, Waisman D (2013) Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int J Mol Sci* 14: 6259-6305.
- Bhattacharya P, Sarmah D, Dave KR, Goswami A, Watanabe M, Wang X, Kalia K, Plesnila N, Yavagal DR, Alvarez O (2021) Stroke and stroke prevention in sickle cell anemia in developed and selected developing countries. *J Neurol Sci* 427, 117510.
- Bitoungui VJ, Pule GD, Hanchard N, Ngogang J, Wonkam A (2015) Beta-globin gene haplotypes among cameroonians and review of the global distribution: is there a case for a single sickle mutation origin in Africa? *OMICS*. 2015

Mar;19(3):171-9.

- Blackburn SL, Kumar PT, McBride D, Zeineddine HA, Leclerc J, Choi HA, Dash PK, Grotta J, Aronowski J, Cardenas JC et al. (2018) Unique contribution of haptoglobin and haptoglobin genotype in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Front Physiol* May 31; 9:592.
- Blair HA (2020) Crizanlizumab: First Approval. *Drugs* 80(1):79– 84.
- Blobel GA, Bodine D, Brand M, Crispino J, de Bruijn MFTR, Nathan D, Papayannopoulou T, Porcher C, Strouboulis J, Zon L, Higgs DR et al. (2015) An international effort to cure a global health problem: A report on the 19th Hemoglobin Switching Conference. *Exp Hematol* 43(10):821-837.
- Borg J, Phylactides M, Bartsakoulia M, Tafrali C, Lederer C, Felice a E, Papachatzopoulou A, Kourakli A, Stavrou EF, Christou S et al. (2012) KLF10 gene expression is associated with high fetal hemoglobin levels and with response to hydroxyurea treatment in beta-hemoglobinopathy patients. *Pharmacogenomics* 13:1487–1500.
- Brandow AM, Liem RI (2022) Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease. *J Hematol Oncol* Mar 3;15(1):20.
- Brewin J, Kaya B, Chakravorty S (2017) How I manage sickle cell patients with high transcranial Doppler results. *Br J Haematol*. 179(3): 377-388.
- Brittenham G, Lozoff B, Harris JW, Sharma VS, Narasimhan S (1977) Sickle cell anemia and trait in a population of southern India. *Am J Hematol* 2(1): 25–32.
- Broderick J, Talbot GT, Prenger E, Leach A, Brott T (1993) Stroke in children within a major metropolitan area: the surprising importance of intracerebral hemorrhage. *Journal of child neurology* Jul;8(3):250-5.
- Brousse V, Colin Y, Pereira C, Arnaud C, Odi`evre MH, Boutemy A, Guitton C, Montalembert M, Lapoum rouli C, Picot J et al. (2015) Erythroid adhesion molecules in sickle cell Anaemia infants: insights into early pathophysiology. *EBioMedicine* 2:154–157.
- Brousseau DC, Panepinto JA, Nimmer M, Hoffmann RG (2010) The number of people with sickle cell disease in the United States: national and state estimates. *Am J Hematol* 85:77-78.
- Buchanan G, Vichinsky E, Krishnamurti L, Shenoy S (2010) Severe sickle cell disease pathophysiology and therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 16 S64–S67.

- Bunn HF, McDonough M (1974) Asymmetrical hemoglobin hybrids. An approach to the study of subunit interactions. *Biochemistry* 13(5):988-993.
- Bunn HF, Nathan DG, Dover GJ, Hebbel RP, Platt OS, Rosse WF, Ware RE (2010) Pulmonary hypertension and nitric oxide depletion in sickle cell disease. *Blood* 116(5):687–692.
- Cabral CHK, Serafim ÉSS, de Medeiros WRDB, Fernandes TAAM, Kamura EM, Costa FF, Sonati MF, Rebecchi IMM, Medeiros TMD (2011) Determination of β S haplotypes in patients with sickle-cell anemia in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Genet Mol Biol* 34:421–424.
- Camilo-Araujo RF, Amancio OMS, Figueiredo MS, Cabañas-Pedro AC, Braga JAP, (2014) Molecular analysis and association with clinical and laboratory manifestations in children with sickle cell anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 36:334–339.
- Canani L H, Ng DPK, Smiles A, Rogus JJ, Warram JH, Krolewski AS (2002) Polymorphism in Ecto-Nucleotide Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes. *Diabetes*, v. 51, n. April, p. 1188–1193.
- Cançado RD, Jesus JA (2007) A doença falciforme no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 29:204-6.
- Carden MA, Jane Little J (2019) Emerging disease-modifying therapies for sickle cell disease. *Haematologica* Sep;104(9):1710-1719.
- Cardoso GL, Guerreiro JF (2010) Molecular characterization of sickle cell anemia in the Northern Brazilian state of Pará. *Am J Hum Biol* 22:573–577.
- Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H et al. (2001) Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 7:575-583.
- Castro O, Brambilla D, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P, Vera JC, Levy PS (1994) The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 84:643–649.
- Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, McMahon RP, Bonds DR (1995) Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the multicenter study of hydroxyurea in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 332(20):1317–1322.

- Chasserot-Golaz S, Vitale N, Jenck EU, Knight D, Gerke V, Bader MF (2005) Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell* 16: 1108–1119.
- Chen Y, Yang P, Li F, Hou S, Jiang Z, Shu Q, Kijlstra A (2012). Association analysis of TGFBR3 gene with Vogt-Koyanagi-Harada disease and Behcet's disease in the Chinese Han population. *Current Eye Research*, 37(4), 312–317.
- Coic L, Leveille E, Lemarchand E, Lesprit E, Abadie I, Medejel N, Madhi F, Lemerle S, Biscardi S, Bardakdjian J, Galacteros F, Torres M, Kuentz M, Ferry C, Socie G, Reinert P, Delacourt C (2011) Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. *Blood* 117(4):1130–1140.
- Colombatti R, De BE, Bertomoro A, Casonato A, Pontara E, Omenetto E, Saggiorato G, Steffa A, Damian T, Cella G et al (2013) Coagulation activation in children with sickle cell disease is associated with cerebral small vessel vasculopathy. *PLoS One* 8(10):e78801.
- Colombatti R, Palazzi G, Masera N, Notarangelo LD, Bonetti E, Samperi P, Barone A, Perrotta S, Fachini H, Miani M, Del Vecchio GC, Guerzoni ME, Corti P, Menzato F, Cesaro S, Casale M, Rigano P, Forni GL, Ruso G, Sainati L, Italian Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia Investigators (2018) Hydroxyurea prescription, availability and use for children with sickle cell disease in Italy: results of a national multicenter survey. *Pediatr Blood Cancer*. 65(2): e26774.
- Connes P, Verlhac S, Bernaudin F (2013) Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 161(4):484-498.
- Cox SE, Makani J, Soka D, L'Esperence VS, Kija E, Dominguez-Salas P, Newton CHJ, Birch AA, Prentice AM, Kirkham FJ (2014) Haptoglobin, alpha-thalassaemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase polymorphisms and risk of abnormal transcranial Doppler among patients with sickle cell anaemia in Tanzania. *Br J Haematol* 165(5):699-706.
- Da Silva MAL, Friedrisch JR, Bittar CM (2014) B-Globin gene cluster haplotypes and clinical severity in sickle cell anemia patients in Southern Brazil. *Open J Blood Dis* 04:16–23.

- Das SS and Chakravorty N (2018) MicroRNA–mRNA interaction network indicates a major role of MAPK pathway in fetal hemoglobin reactivation in beta-thalassemia. *N Biotechnol* 44:S94–S95.
- Das SS, Sinha R and Chakravorty N (2019) Integrative microRNA and gene expression analysis identifies new drug repurposing candidates for fetal hemoglobin induction in β -hemoglobinopathies. *Gene* 706:77–83.
- Deane CR, Goss D, Bartram J, Pohl KRE, Height SE, Sibtain N, Jarosz J, Thein SL, Rees DC (2010) Extracranial internal carotid arterial disease in children with sickle cell anemia. *Haematologica* 95:1287-1292.
- DeBaun MR, Armstrong FD, McKinstry RC, Ware RE, Vichinsky E, Kirkham FJ (2012) Silent cerebral infarcts: a review on a prevalent and progressive cause of neurologic injury in sickle cell anemia. *Blood* May 17;119(20):4587-96.
- DeBaun MR, Gordon M, McKinstry RC, Noetzel MJ, White DA, Sarnaik SA, Meier ER, Howard TH, Majumdar S, Inusa BPD et al. (2014) Controlled trial of transfusion for silente cerebral infacts in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 371:699-710.
- DeBaun MR, Jordan LC, King AA, Schatz J, Vichinsky E, Fox CK, McKinstry RC, Telfer P, Kraut MA, Daraz L, Kirkham FJ, Murad MH (2020) American Society of Hematology 2020 guidelines for sickle cell disease: prevention, diagnosis, and treatment of cerebrovascular disease in children and adults. *Blood Adv* Apr 28;4(8):1554-1588.
- DeBaun MR, Sarnaik SA, Rodeghier MJ, Minniti CP, Howard TH, Iyer RV, et al. (2012) Associated risk factors for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: low baseline hemoglobin, sex, and relative high systolic blood pressure. *Blood* 119(16):3684–90.
- De Montalembert M, Wang W (2013) Cerebrovascular complications in children with sickle cell disease. *Handb Clin neurol* 113:1937-43.
- Desai AA, Lei Z, Bahroos N, Maienschein-Cline M, Saraf SL, Zhang X, Shah BN, Nouraie SM, Abbasi T, Patel AR, Lang RM et al. (2017) Association of circulating transcriptomic profiles with mortality in sickle cell disease. *Blood* Jun 1;129(22):3009-3016.
- Dobson SR, Holden K.R, Nietert PJ, Cure JK, Laver JH, Disco D, Abboud MR (2002) Moyamoyasyn drome in childhood sickle cell disease: apredictive factor for recurrent cerebrovascular event. *Blood* 99:3144-3150.

- Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J (1992) Rapid analysis of α 3.7 thalassaemia and α α α anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol* 82:105–111.
- Driscoll MC, Hurlet A, Styles L, McKie V, Files B, Olivieri N, Pegelow C, Bermon B, Drachtman R, Patel K et al. (2003) Stroke risk in siblings with sickle cell anemia. *Blood* 101:2401-2404.
- Driss A, Asare KO, Hibbert JM, Gee BE, Adamkiewicz TV, Stiles JK (2009) Sickle Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. *Genomics Insights* 2009(2):23-48.
- Dykes GW, Crepeau RH, Edelstein SJ (1978) Three-dimensional reconstruction of the fibres of sickle cell haemoglobin. *Nature*. 272(5653):506-510.
- Du Z, Zheng J, Zhang Z, Wang Y (2017) Review of the endothelial pathogenic mechanism of TIE2-related venous malformation. *Journal of Vascular Surgery, (Vm)*, 1–9.
- Du Z, Zheng J, Zhang Z, Wang Y (2017) Review of the endothelial pathogenic mechanism of TIE2-related venous malformation. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* Sep;5(5):740-748.
- Duits AJ, Rodriguez T, Schnog JJB (2006) Serum level so fangiogenic factor syndicate apro angiogenic state in adults with sickle cell disease. *Br J. Haematol* 134:116-119.
- Eaton WA (2003) Linus Pauling and sickle cell disease. *Biophys Chem* 100(1-3):109-16.
- Eaton WA, Bunn HF (2007) Treating sickle cell disease by targeting HbS polymerization. *Blood* 129:2719-26.
- Eaton WA (2020) Hemoglobin S polymerization and sickle cell disease: A retrospective on the occasion of the 70th anniversary of Pauling's Science paper. *Am J Hematol* Feb;95(2):205-211.
- Eckrich MJ, Wang WC, Yang E, Arbogast PG, Morrow A, Dudley JA, Ray WA, Cooper WO (2013) Adherence to transcranial Doppler screening guidelines among children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer* Feb;60(2):270-4.
- Eklund L, Kangas J, Saharinen P (2017). Angiopoietin – Tie signalling in the cardiovascular and lymphatic systems. *Clin Sci (Lond)* Jan 1;131(1):87.
- Enenstein J, Milbauer L, Domingo E, Wells A, Roney M, Kiley J, Wei P, Hebbel RP

- (2010) Pro inflammatory phenotype with imbalance of KLF2 and RelA: risk of childhood stroke with sickle cell anemia. *Am J Hematol* 85:18-23.
- Engel ER, Howard AL, Ankus EJ, Rico JF (2020) Advances in sickle cell disease management. *Adv Pediatr* 67:57–71.
- Ergul S, Brunson CY, Hutchinson J (2004) Vasoactive factors in sickle cell disease: in vitro evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction. *Am. J. Hematol.* 76: 245–251.
- Estcourt LJ, Kohli R, Hopewell S, Trivella M, Wang WC (2020) Blood transfusion for preventing primary and secondary stroke in people with sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev* 7(7): Cd003146.
- Fan X, Yu Z, Liu J, Liu N, Hajjar KA, Furie KL, Lo EH, Wang X (2010) Annexin A2: a tissue plasminogen activator amplifier for thrombolytic stroke therapy. *Stroke* 41: S54-S58.
- Faure AV, Migne C, Devilliers G, Ayala-Sanmartin J (2002) Annexin 2 "secretion" accompanying exocytosis of chromaffin cells: possible mechanisms of annexin release. *Exp. Cell Res.* 276: 79-89.
- Fasano RM, Meier ER, Hulbert ML (2015) Cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis* 54:17-25.
- Faye BF, Sow D, Seck M, Dieng N, Toure SA, Gadjiri N, Senghor AB, Gueye YB, Sy D, Sall A et al. (2017) Efficacy and safety of manual partial red cell exchange in the management of severe complications of sickle cell disease in a developing country. *Adv Hematol.* 2017:3518402.
- Fertrin KY, Costa FF (2010) Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. *Expert Rev Hematol* 3:443–458.
- Figueiredo MS, Kerbaui J, Gonçalves MS, Arruda VR, Saad STO, Sonati MF, Stoming T, Costa FF (1996) Effect of α -thalassemia and β -globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. *Am J Hematol* 53:72–76.
- Filho ILS, Ribeiro GS, Pimenta-Bueno LM, Serpa MJA (2010) The frequency of β -globin gene haplotypes, α -thalassemia and genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase, factor V Leiden and prothrombin genes in children with sickle cell disease in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 32: 76–78.

- Flanagan JM, Frohlich DM, Howard TA, Schultz WH, Driscoll C, Nagasubramanian R, Mortier NA, Kimble AC, Aygun B, Adams RJ et al. (2011) Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood* 117: 6681-6684.
- Flanagan JM, Steward S, Howard TA, Mortier NA, Kimble AC, Aygun B, Hankins JS, Neale GA, Ware RE (2012) Hydroxycarbamide alters erythroid gene expression in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 157:240–248.
- Flanagan JM, Sheehan V, Linder H, Howard TH, Wang YD, Hoppe CC, Aygun B, Adams RJ, Neal GA, Ware RE (2013) 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.
- Flood EC, Hajjar KA (2011) The annexin A2 system and vascular homeostasis. *Vascul.Pharmacol.* 54: 59-67.
- Ford AL, Ragan DK, Fella S, Binkley MM, Fields ME, Williams KP, An H, Jordan LC, McKinstry RC, Lee JM et al. (2018) Silent infarcts in sickle cell disease occur in the border zone region and are associated with low cerebral blood flow *Blood* 132(16):1714-1723.
- Fortin PM, Hopewell S, Estcourt LJ (2018) Red blood cell transfusion to treat or prevent complications in sickle cell disease: an overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst Rev* Aug 1;8:CD012082.
- Fullerton HJ, Gardner M, Adams RJ, Lo LC, Johnston SC (2006) Obstacles to primary stroke prevention in children with sickle cell disease. *Neurology*. Sep 26;67(6):1098-9.
- Crowley MR, Frost A, Chen DT, Baffi MO, Nicola T, Serra R (2006) Transforming growth factor-beta signaling helps specify tumor type in DMBA and hormone-induced mammary cancers. *Differentiation* Feb;74(1):40-52.
- Galarneau G, Palmer CD, Sankaran VG, Orkin SH, Hirschhorn JN, Lettre G (2010) Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. *Nat Genet* 42:1049–1051.
- Garner C, Tatu T, Reittie JE, Littlewood T, Darley J, Cervino S, Farrall M, Kelly P, Spector TD, Thein SL (2000) Genetic influences on F cells and other hematologic variables: A twin heritability study. *Blood* 95:342–346.
- Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, Pegelow CH, Vichinsky E (1995) Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 86(2):776-

83.

- Gluckman E, Cappelli B, Bernaudin F, Labopin M, Volt F, Carreras J, Simões BP, Fester A, Dupont S, de la Fuente J et al (2017) Sickle cell disease: an international survey of results of HLA- identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 129(11):1548–56.
- Guilliams KP, Fields mE, Dowling MM (2019) Advances in understanding ischemic stroke physiology and the impact of vasculopathy in children with sickle cell disease. *Stroke* 50: 266–273.
- Goldfine ID, Maddux BA, Youngren JF, Reaven J, Accili D, Trischitta V, Vigneri R, Frittitta L (2008) The role of membrane glycoprotein plasma cell antigen 1/ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 in the pathogenesis of insulin resistance and related abnormalities. *Endocrine Reviews* Feb;29(1):62-75.
- Goonasekera HW, Paththinige CS, Dissanayake VHW (2018) Population Screening for Hemoglobinopathies. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* Aug 31;19:355-380.
- Govinden R, Bhoola K D (2003) Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- β . *Pharmacology and Therapeutics* 98(2),257 265.
- Gravitz L, Pincock S (2014) Sickle cell disease. *Nature* Nov 13;515(7526):S1.
- Griffin PJ, Sebastiani P, Edward H, Paldwin C, Gladwin MT, Gordeuk VR, Chui DHK, Steinberg MH (2014) The genetics of hemoglobin A regulation in sickle cell anemia. *Am J Hematol* 89(11):1019-1.
- Groeneveld M E, Bogunovic N, Musters RJP, Tangelder GJ, Pals G, Wisselink W, Yeung KK (2018). Betaglycan (TGFB3) up-regulation correlates with increased TGF- β signaling in Marfan patient fibroblasts in vitro. *Cardiovascular Pathology*, 32, 44–49.
- Grosse SD, Odame I, Atrach HQ, Amendah DD, Piel FB, Williams TN (2011) Sickle cell disease in Africa: a neglected cause of early childhood mortality. *Am. J. Prev. Med.* 41 (2011) S398–S405.
- Gueguen A, Mahevas M, Nzouakou R, Hosseini H, Habibi A, Bachir D, Brugiere P, Lonnet F, Ribi JA, Godeau B et al. (2014) Sickle cell disease stroke through outlife: a retrospective study in an adult referral center. *Am J Hemat* 89:267-272.
- Guyatt G, Oxman AD, Akl EA, Kaunz R, Vist G, Brozek J, Norris S, Falck-Ytter Y,

- Glasziou P, DeBeer H et al. (2011) GRADE guidelines: 1. Introduction-GRADE evidence profiles and summary of findings tables. *J Clin Epidemiol* 64(4):383-394.
- Hassell KL (2010) Population estimates of sickle cell disease in the U.S. *Am J Prev Med*;38:S512-S521.
- Hacker BM, Tomlinson JE, Wayman GA, Sultana R, Chan G, Villacres E, Distech C, Storn DR (1998) Cloning, chromosomal mapping, and regulatory properties of the human type 9 adenylyl cyclase (ADCY9). *Genomics* May 15;50(1):97-104.
- Hall EM, Leonard J, Smith JL, Williams KP, Binkley M, Fallon RJ, Hulbert ML (2016) Reduction in over tandsilent stroke recurrence rate following cerebral revascularization surgeryin children with sickle cell disease and severe cerebral vasculopathy. *Pediar Blood Cancer* 63:1431-1437.
- Hankins JS, Fortner GL, McCarville MB, Smeltzer MP, Wang WC, Li CS, Ware RE (2008) The Natural History of Conditional Transcranial Doppler Flow Velocities in Children with Sickle Cell Anaemia. *Br J Haematol*. Jul 142(1): 94–9.).
- Hankins JS, McCarville MB, Rankine-Mullings A, Reid ME, Lobo CLC, Moura PG, Ali S, Soares DP, Aldred K, Jay DW et al. (2015) Prevention of conversion to abnormal transcranial Doppler with hydroxyurea in sickle cell anemia: a phase III international randomized clinical trial. *Am J Hematol*. 90(12):1099-1105.
- Hankinson TC, Bohman L E, Heyer G, Licursi M, Ghatan S, Feldstein MA, Anderson RC (2008) Surgical treat ment of moyamoya syndrome in patients with sickle cell anemia: out come following encephaloduro arteriosynan-giosis. *J.Neurosurg Pediatr* 1:211-216.
- Harahap AR; Goding JW (1988) Distribution of the murine plasma cell antigen PC-1 in non-lymphoid tissues. *J Immunol* Oct 1;141(7):2317-20.
- Hardison RC (2012) Evolution of hemoglobin and its genes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(12):a011627.
- Hasson C, Veling L, Rico J, Mhaskar R (2019) The role of hydroxyurea to prevent silent stroke in sickle cell disease: Systematic review and meta-analysis. *Medicine* 98, e18225.
- Hatzlhofer BLD, Pereira-Martins DA, Domingos IF, Arcanjo GS, Weinhauser I, Falcão DA, Farias CC, Batista JVGF, Prado LPL, Oliveira JMF et al. (2021) Alpha thalassemia, but not β S-globin haplotypes, influence sickle cell anemia

- clinical outcome in a large, single-center Brazilian cohort. *Ann Hematol* Apr;100(4):921-931.
- Hedhli N, Falcone DJ, Huang B, Cesarman-Maus G, Kraemer R, Zhai H, Tsirka SE, Santambrogio L, Hajjar KA (2012) The annexin A2/S100A10 system in health and disease: emerging paradigms. *J. Biomed. Biotechnol* 2012:406273.
- Helton KJ, Adams RJ, Kesler KL, Lockhart A, Aygun B, Driscoll C, Heeney MM, Jackson SM, Krishnamurti L, Miller ST et al. (2014) Magnetic resonance imaging/angiography and transcranial Doppler velocities in sickle cell anemia: results from the SWITCH trial. *Blood* Jun 9.
- Henderson JN, Noetzel MJ, McKinstry RC, White DA, Armstrong M, DeBaun MR (2003) Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome and silent cerebral infarcts are associated with severe acute chest syndrome in children with sickle cell disease. *Blood*. 2003;101(2):415.
- Henry ER, Cellmer T, Dunkelberger EB, Metaferia B, Hofrichter J, Li Q, Ostrowski D, Ghirlando R, Louis JM, Motereau S et al. (2020) Allosteric control of hemoglobin S fiber formation by oxygen and its relation to the pathophysiology of sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 117(26): 15018-15027.
- Herity LB, Vaughan DM, Rodriguez LR, Lowe DK (2021) Voxelotor: a novel treatment for sickle cell disease. *Ann Pharmacother* 55(2):240–245.
- Hibbert JM, Hsu LL, Bhathena SJ, Irune I, Sarfo B, Creary MS, Gee BE, Mohamed AI, Buchanan ID, Al-Mahmoud A (2005) Proinflammatory cytokines and the hypermetabolism of children with sickle cell disease. *Exp. Biol. Med* 230, 68–74.
- Higgins SJ, De Ceunynck K, Kellum J A, Chen X, Gu X, Chaudhry SA, Schulman S, Libermann TA, Lu S, Shapiro M et al. (2018) Tie2 protects the vasculature against thrombus formation in systemic inflammation. *J Clin Invest* Apr 2;128(4):1471-1484.
- High KA, Roncarolo MG (2019) Gene therapy. *N Engl J Med* 381(5):455–464.
- Hogan AM, Pit-ten Cate IM, Vargha-Khadem F, Prengler M, Kirkham FJ (2006) Physiological correlates of intellectual function in children with sickle cell disease: hypoxaemia, hyperaemia and brain infarction. *Dev Sci* Jul;9(4):379-87.
- Hokazono M, Silva GS, Silva EMK, Braga JAP (2011) Results from transcranial

- Doppler examination on children and adolescents with sickle cell disease and correlation between the time-averaged maximum mean velocity and hematological characteristics: a cross-sectional analytical study. *Sao Paulo Med J*.129(3):134-138.
- Hoppe C, Klitz W, Cheng S, Apple R, Steiner L, Robles L, Girard T, Vichinsky E, Styles L (2004) Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood* 103(6):2391–2396.
- Hsu LL, Miller ST, Wright E, Kutlar A, McKie V, Wang W, Pegelow CH, Driscoll C, Hurlet A, Woods G et al. (2003) Alpha Thalassemia is associated with decreased risk of abnormal transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 25(8):622-628.
- Hulbert ML, McKinstry RC, Lacey JL, Moran CJ, Panepinto JA, Thompson AA, Sarnaik SA, Woods GM, Casella JF, Inusa B et al. (2011) Silent cerebral infarcts occur despite regular blood transfusion therapy after first strokes in children with sickle cell disease. *Blood* 117, 772–779.
- Huttle A, Maestre G, Lantigua R and Green N (2015) Sickle Cell in Sickle Cell Disease in Latin America and the United States. *Pediatr Blood Cancer* 62:1131–1136.
- Hyacinth HI, Gee BE, Adamkiewicz TV, Adams RJ, Kutlar A, Stiles JK, Hibbert JM (2012) Plasma BDNF and PDGF-AA levels are associated with high TCD velocity and stroke in children with sickle cell anemia. *Cytokine* 60(1):302–308.
- Ikawa Y, Miccio A, Magrin E, Kwiatkowski JL, Rivella S, Cavazzana M (2018) Gene therapy of hemoglobinopathies: progress and future challenges. *Hum Mol Genet* 28(R1).
- Ingram VM (1956) A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anemia hemoglobin. *Nature*.178:792–4.
- Inusa B, Casale M, Booth C, Lucas S (2014) Subarachnoid haemorrhage and cerebral vasculopathy in a child with sickle cell anaemia. *BMJ Case Rep* Oct 21;2014:bcr2014205464.
- Jackson JF, Odom JL, Bell WN (1961) Amelioration of sickle cell disease by persistent fetal hemoglobin. *JAMA* 177: 867–9.
- Joly P, Garnier N, Kebaili K, Renoux C, Dony A, Chikh N, Renard C, Ceraulo A, Cuzzubbo D, Pondarre C et al. (2016) G6PD deficiency and absence of alpha-thalassemia increase the risk for cerebral vasculopathy in children with

- sickle cell anemia. *Eur J Haematol.* 96(4):404-408.
- Jordan LC, Casella JF, Debaun MR (2012) Prospects for primary stroke prevention in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* Jan 9;157(1):14-25.
- Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH (2007) Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev* 21(1):37–47.
- Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, Gladwin MT (2009) Vasculopathy in sickle cell disease: biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *Am J Hematol* 84(9): 618–25.
- Kato K, Nishimasu H, Okadaira S, Mihara E, Ishitani R, Takagi J, Aoki J, Nureki O (2012) Crystal structure of ENPP1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* Oct 16;109(42):16876-81.
- Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT (2017) Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease, *J. Clin. Invest.* 127: 750–760.
- Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, Smith WR, Panepinto JA, Weatherall DJ, Costa FF, Vichinsky EP (2018) Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers* Mar 15;4:18010.
- Kassim AA, Pruthi S, Day M, Rodeghier M, Gindville MC, Brodsky MA, DeBaun MR, Jordan LC (2016) Silent cerebral infarcts and cerebral aneurysms are prevalent in adults with sickle cell anemia. *Blood* 127, 2038 2040.
- Kaul DK, Fabry ME, Windisch P, Baez S, Nagel RL (1983) Erythrocytes in sickle cell anemia are heterogeneous in their rheological and hemodynamic characteristics. *J Clin Invest* 72(1):22-31.
- Kaul DK, Liu XD (1999) Rate of deoxygenation modulates rheologic behavior of sickle red blood cells at a given mean corpuscular hemoglobin concentration. *Clin Hemorheol Microcirc* 21(2):125-35.
- Kennedy BC, McDowell MM, Yang PH, Wilson CM, Li S, Hankinson TC, Feldstein NA, Anderson RCE (2014) Pial synangiosis for moyamoya syndrome in children with sickle cell anemia: a comprehensive review of reported cases. *Neurosurg Focus* Jan;36(1):E12.
- Khan AA, Sandhya VK, Singh P, Parthasarathy D, Kumar A, Advani J, Gattu R, Ranjit DV, Vaidyanathan R, Mathur PP (2014) Signaling Network Map of Endothelial TEK Tyrosine Kinase. *J Signal Transduct*; 2014:173026.

- Kim HC (2014) Red cell exchange: special focus on sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014:450-456.
- Kirkham FJ, Hewes DK, Prengler M, Wade A, Lane R, Evans JP (2001) Nocturnal hypoxaemia and central-nervous-system events in sickle-cell disease. *Lancet* 357(9269):1656–1659.
- Kirkham FJ and Lagunju IA (2021) Epidemiology of Stroke in Sickle Cell Disease. *J Clin Med* Sep 18;10(18):4232.
- Klings ES, Steinberg MH (2022) Acute chest syndrome of sickle cell disease: genetics, risk factors, prognosis, and management. *Expert Rev Hematol* Feb;15(2):117-125.
- Koehl JL, Koyfman A, Hayes BD, Long B (2022) High risk and low prevalence diseases: Acute chest syndrome in sickle cell disease. *Am J Emerg Med*. Aug;58:235-244.
- Kosinski PD, Croal PL, Leung J, Williams S, Odame I, Hare GMT, Shroff M, Kassner A (2017) The severity of anaemia depletes cerebrovascular dilatory reserve in children with sickle cell disease: a quantitative magnetic resonance imaging study. *Br. J. Haematol.* 176: 280–287.
- Kratovil T, Bulas D, Driscoll MC, Speller-Brown B, McCarter R, Minniti CP (2006) Hydroxyurea therapy lowers TCD velocities in children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer* 47(7):894-900.
- Kubaszek A, Markkanen A, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C, Baiker DJP, Laakso N (2004) The Association of the K121Q Polymorphism of the Plasma Cell Glycoprotein-1 Gene with Type 2 Diabetes and Hypertension Depends on Size at Birth. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 89, n. 5, p. 2044–2047.
- Kutlar A, Kanter J, Liles DK, Alvarez OA, Cançado RD, Friedrisch JR, Knight-Madden JN, Bruedle A, Shi M, Zhu Z et al. (2019) Effect of crizanlizumab on pain crises in subgroups of patients with sickle cell disease: a SUSTAIN study analysis. *Am J Hematol* 94(1):55–61.
- Kwiatkowski JL, Hunter JV, Smith Whitley K, Katz ML, Shults J, Ohene-Frempong K (2003) Transcranial Doppler ultrasonography in siblings with sickle cell disease. *BrJHaemato* 121:932-937.
- Lagunju IA, Brown BJ, Sodeinde OO (2013) Chronic blood trans- fusion for primary and secondary stroke prevention in Nigerian children with sickle cell disease:

- a 5-year appraisal. *Pediatr Blood Cancer* 60(12):1940–1945.
- Lagunju I, Sodeinde O, Brown B, Akinbami F, Adedokun B (2014) Transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell anemia: clinical and laboratory correlates for elevated blood flow velocities. *J Clin Ultrasound* 42(2):89–95.
- Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad STO, Conran N, Costa FF (2009) Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J. Leukoc.Biol* 85, 235–242.
- Lawrence C, Webb J (2016) Sickle cell disease and stroke: diagnosis and management. *Curr Neurol Neurosci Rep* 16:27.
- Lee MT, Piomelli S, Granger S, Miller ST, Harkness S, Brambilla DJ, Adams RJ (2006) Stroke prevention trial in sickle cell anemia (STOP): extended follow-up and final results. *Blood* 108:847-852.
- Leite AC, de Oliveira RV, de Moura PG, Silva CM, Lobo C (2012) Abnormal transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell disease. *Rev Bras Hematol Hemoter* 34(4):307-10.
- Leonardo FC, Brugnerotto AF, Domingos IF, Fertrin KY, de Albuquerque DM, Bezerra MAC, Araújo AS, Saad STO, Costa FF, Menzel S, Conran N, Thein SL (2016) Reduced rate of sickle-related complications in Brazilian patients carrying HbF-promoting alleles at the BCL11A and HMIP-2 loci, *Br. J. Haematol.* 173 456–460.
- Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MC, Araujo AS, Uda M, Sanna S, Cao A, Schlessinger D, Costa FF, Hirschhorn JN et al. (2008) DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA* Aug 19;105(33):11869–74.
- Lettre G, Bauer DE (2016) Fetal haemoglobin in sickle-cell disease: from genetic epidemiology to new therapeutic strategies. *Lancet* 387(10037):2554-2564.
- Li, D., Liu, K., Li, Z., Wang, J., & Wang, X. (2018). miR-19a and miR-424 target TGFBR3 to promote epithelial-to-mesenchymal transition and migration of tongue squamous cell carcinoma cells. *Cell Adhesion and Migration*, 12(3), 236–246. <https://doi.org/10.1080/19336918.2017.1365992>.
- Lindenau JD, Wagner SC, Castro SM, Hutz MH (2016) *Genet Mol Biol.* Oct-

Dec;39(4):515-523.

- Lindermayr, C.; Durner, J. (2015) Interplay of reactive oxygen species and nitric oxide: Nitric oxide coordinates reactive oxygen species homeostasis. *Plant Physiol* 167, 1209–1210.
- Pauling L, Harvey A, Itano HA, Singer SJ, Wells IC (1949) Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science*, November, Vol.110, 543-548.
- Lo W, Zamel K, Ponnappa K, Allen A, Chisolm D, Tang M, Kerlin B, Yeates KO (2008) The cost of pediatric stroke care and rehabilitation. *Stroke* 39(1):161–5.
- Ludwig M.-G; Seuwen, K (2002) Characterization of the human adenylyl cyclase gene family: cDNA, gene structure, and tissue distribution of the nine isoforms. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 22: 79-110.
- Mabaera R, West RJ, Conine SJ, Macari ER, Boyd CD, Engman CA, Lowrey CH (2008) A cell stress signaling model of fetal hemoglobin induction: what doesn't kill red blood cells may make them stronger. *Exp Hematol* 36:1057–1072.
- Malowany JI, Butany J. (2012) Pathology of sickle cell disease. *Seminars in diagnostic pathology* Feb;29(1):49-55.
- Matsui NM, Borsig L, Rosen SD, Yaghmai M, Varki A, Embury SH (2001) P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. *Blood* 98:1955–1962.
- McGann PT, Niss O, Dong M, Marahatta A, Howard T, Mizuno T, Adam Lane A, Kalfa TA, Punam Malik P, Quinn CT, Russell E, Ware RE, Vinks AA (2019) Robust Clinical and Laboratory Response to Hydroxyurea Using Pharmacokinetically Guided Dosing for Young Children with Sickle Cell Anemia. *Am J Hematol* August ; 94(8): 871–879.
- Meier ER, Miller JL. (2012) Sickle cell disease in children. *Drugs*. May 7;72(7):895-906.
- Meier ER, Wright EC, Miller JL (2014) Reticulocytosis and anemia are associated with an increased risk of death and stroke in the newborn cohort of the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Am J Hematol* 89(9):904–906.
- Meier ER, Fasano RM, Estrada M, He J, Luban NL, McCarter R (2016) Early reticulocytosis and anemia are associated with abnormal and conditional transcranial Doppler velocities in children with sickle cell anemia. *J Pediatr.*

169:227-231.

- Melo HA, Barreto-Filho JAS, Prado RC, Cipolotti R (2008) Transcranial doppler in sickle cell anaemia: evaluation of brain blood flow parameters in children of Aracaju, Northeast-Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*. 66(2b):360-4.
- Menell JS, Cesarman GM, Jacovina AT, McLaughlin MA, Lev EA, Hajjar KA (1999) Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *N.Engl.J.Med*. 340: 994 1004.
- Menzel S, Thein SL (2019) Genetic modifiers of fetal haemoglobin in sickle cell disease. *Mol Diagn Ther* 23(2):235-244.
- Meyre D, Bouatia-Naji N, Tounian A, Samson C, Lecoeur C, Vatin V, Ghoussaini M, Wachter C, Hercberg S, Charpentier G, Patsch W et al. (2005) Variants of ENPP1 are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and type 2 diabetes. *Nature Genetics*, v.37, n. 8, p. 863–867.
- Merkel KH, Ginsberg PL, Parker JC, Post MJ (1978) Cerebrovascular disease in sickle cell anemia: a clinical, pathological and radiological correlation. *Stroke* 9(1):45-52.
- Mikobi TM, Lukusa PT, Aloni MN, Lumaka A, Aqilimali PZ, Devriendt K, Matthijs G, Muamba JMM, Race V (2018) Association between sickle cell anemia and alpha thalassemia reveals a high prevalence of the alpha(3.7) triplication in congolese patients than in worldwide series. *J Clin Lab Anal* 32(1):e22186.
- Miller ST, Sleeper LA, Pegelow CH, Enos LE, Wang WC, Weiner SJ, WethersDL, Smith J, Kinney TR (2000) Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. *N Engl J Med* 342(2):83–89.
- Miller ST, Macklin EA, Pegelow CH, Kinney TR, Sleeper LA, Bello JA, DeWitt LD, Gallagher DM, Guarini L, Moser FG, Ohene-Frempong K, Sanchez N, Vichinsky EP, Wang WC, Wethers DL, Younkin DP, Zimmerman RA, DeBaun MR (2001) Silent infarction as a risk factor for overt stroke in children with sickle cell anemia: a report from the Cooperative Study of Sickle Cell Disease *J Pediatr* Sep;139(3):385-90.
- Moehlecke, M, Kramer CK, Leitão CB, Krahe AL, Balbosco I, Azevedo MJ, Gross JL, Canani LH (2010) ENPP1 K121Q polymorphism and ischemic heart disease in diabetic patients. *Arq Bras Cardiol* 94(2):157-61.
- Mohanty D (2014) A century after discovery of sickle cell disease: keeping hope

alive! Indian J Med Res 139, June, pp 793-795.

- Montalembert M, Voskaridou E, Oevermann L, and all ESCORT HU Investigators (2021) Real-Life experience with hydroxyurea in patients with sickle cell disease: Results from the prospective ESCORT-HU cohort study. *Am J Hematol* Oct 1;96(10):1223-1231.
- Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, Hazen SL, Vichinsky EP, Morris SM, Gladwin MT (2005) Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA* 294(1):81–90.
- Morse PD, Warth JA (1990) Direct measurement of the internal viscosity of sickle erythrocytes as a function of cell density. *Biochim Biophys Acta* 1053(1):49-55.
- Nam, HK, Liu J, Li Y, Kragor A, Hatch N (2011) Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 (ENPP1) protein regulates osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 45, p. 39059–39071.
- Naoum PC (2000) Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Rev bras hematol hemoter* 22(1):05-22.
- Neel JV (1947) The clinical detection of the genetic carriers of inherited disease. *Medicine* 26:115-153.
- Neonato MG, Guillaud-Bataille M, Beauvais P, Bégué P, Belloy M, Benkerrou M, Ducrocq R, Maier-Redelsperger M, de Montalembert M, Quinet B, Elion J, Feingold J, Girot R, French Study Group on Sickle Cell Disease (2000) Acute clinical events in 299 homozygous sickle cell patients living in France. French Study Group on Sickle Cell Disease. *Eur J Haematol* 65:155–164.
- Nichols FT, Jones AM, Adams RJ (2001) Stroke prevention in sickle cell disease (STOP) study guidelines for transcranial Doppler testing. *J Neuroimaging* 2001;11:354–362.
- Niihara Y, Miller ST, Kanter J, Lanzkron S, Smith WR, Hsu LL, Gordeuk VR, Viswanathan K, Sarnaik S, Osunkwo I (2018) A phase 3 trial of l-glu- tamine in sickle cell disease. *N Engl J Med* 379(3):226– 235.
- Nolan VG, Wyszynski DF, Farrer LA, Steinberg MH (2005) Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. *Blood* 106(9):3264).
- Nolan VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Wyszynski DF, Farrell JJ, Sebastiani P, Farrer LA, Steinberg MH (2006) Sickle cell leg users: associations with

- haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. *Br J Haematol* 133(5):570-8.
- Nottage KA, Ware RE, Aygun B, Smeltzer M, Kang G, Moen J, Wang WC, Hankins JS, Helton KJ (2016) Hydroxycarbamide treatment and brain MRI/MRA findings in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* Oct;175(2):331-8.
- Noubiap JJ, Mengnjo MK, Nicastro N, Kamtchum-Tatuene J (2017) Neurologic complications of sickle cell disease in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Neurology* 89:1516-1524.
- Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moehr JW, Wethers DL, Pegelow CH, Gill FM (1998) Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* Jan 1;91(1):288-94.
- Ojewunmi OO, Adeyemo TA, Osuntoki AA, Imaga NA, Oyetunji AI (2018) Haemoglobin oxygen saturation, leucocyte count and lactate dehydrogenase are predictors of elevated cerebral blood flow velocity in Nigerian children with sickle cell anaemia. *Paediatr Int Child Health* Feb;38(1):34-9.
- Olatunya OS, Albuquerque DM, Adekile A, Costa FF (2019) Influence of alpha thalassemia on clinical and laboratory parameters among nigerian children with sickle cell anemia. *J Clin Lab Anal* 33(2):e22656.
- Onyedibe KI; Wang M, Sintim HO (2019) ENPP1, an Old Enzyme with New Functions, and Small Molecule Inhibitors—A STING in the Tale of ENPP1. *Molecules* 19;24(22):4192.
- Oyesola Oyewole Ojewunmi OO, Adeyemo TA, Ajoke Idayat Oyetunji AI, Yewande Benn Y, Ekpo MG, Iwalokun BA (2021) . Association of alpha-thalassemia and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency with transcranial Doppler ultrasonography in Nigerian children with sickle cell anemia. *J Clin Lab Anal* Jun;35(6):e23802.
- Pagnier J, Mears G, Dunda-Belkhodja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL, Labie D (1984) Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci USA*. Mar;81(6):1771-3.
- Papageorgiou DP, Abidi SZ, Chang HY, Li X, Kato GJ, Karniadakis GE, Surech S, Dao M (2018) Simultaneous polymerization and adhesion under hypoxia in sickle cell disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 18;115(38):9473–9478.
- Parikh SM (2017a) Angiopoietins and Tie2 in vascular inflammation. 24(5), 432–438.

- Parikh SM (2017b) *The Angiopoietin-Tie2 Signaling Axis in Systemic Inflammation*. J Am Soc Nephrol 28(7):1973-1982.
- Pauling L, Itano HA, (1949) Sickle cell anemia a molecular disease Science Nov 25;110(2865):543-8.
- Pegelow CH, Macklin EA, Moser FG, Wang WC, Bello JA, Miller ST, Vichinsky EP, DeBaun MR, Guarini L, Zimmerman RA (2002) Longitudinal changes in brain magnetic resonance imaging findings in children with sickle cell disease. Blood Apr 15;99(8):3014-8.
- Perrine RP, Brown MJ, Clegg JB, Weatherall DJ, May A (1972) Benign sickle-cell anaemia. Lancet 2(7788): 1163–7.
- Perrine RP, Pembrey ME, John P, Perrine S, Shoup F (1978) Natural history of sickle cell anemia in Saudi Arabs. A study of 270 subjects. Ann Intern Med 88(1): 1–6.
- Petruzzelli R, Gaudino S, Amendola G, Sessa R, Puzone S, Di Concilio R, D'Urzo G, Amendolara M, Izzo P and Grosso M (2010) Role of the cold shock domain protein A in the transcriptional regulation of HBG expression: Research paper. Br J Haematol 150:689–699.
- Phillips SM, Schlenz AM, Mueller M, Melvin CL, Adams RJ, Kanter J (2021) Identified barriers and facilitators to stroke risk screening in children with sickle cell anemia: results from the DISPLACE consortium. Implement Sci Commun. Aug 10;2(1):87.
- Piccin A, Murphy C, Eakins E, Eakins E, Rondinelli MB, Daves M, Vecchiato C, Wolf D, Mc Mahon C, Smith OP (2019) Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anaemia and possible treatment. Eur J Haematol 102(4):319–330.
- Piel F.B., Hay SI, Gupta S, Weatherall DJ, Williams TN (2013) Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010–2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions, PLoS Med. 10:e1001484.
- Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, Temperley WH, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI (2013) Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geo-statistical model based map and population nestimates. Lancet 381:142-151.
- Piel FB, Steinberg MH and Rees DC (2017) Sickle Cell Disease. N Engl J Med

376:1561–1573.

- Pierrot-Gallo BS, Vicari P, Matsuda SS, Adegoke SA, Mecabo G, Figueiredo MS (2015) Haptoglobin gene polymorphisms and interleukin-6 and -8 levels in patients with sickle cell anemia. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 37,329–335.
- Pizzuti A, Frittitta L, Argiolas A, Baratta R, Goldfine ID, Bozzali M, Ercolino T, Scarlato G, Iacoviello L, Vigneri R, Tassi V, Trischitta V (1999) A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance. *Diabetes*, v. 48, n. 9, p. 1881–1884, 1 set.
- Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, Klug PP (1994) Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 330(23):1639-44.
- Platt OS (2000) The acute chest syndrome of sickle cell disease. *N Engl J Med* 22;342(25):1904-7.
- Platt OS (2005) Preventing stroke in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 2005 Dec 29;353(26):2743-5.
- Polanowska-Grabowska R, Wallace K, Field JJ (2010) P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 2392–2399.
- Powars D, Wilson B, Imbus C, Pegelow C, Allen J (1978) The natural history of stroke in sickle cell disease. *The American journal of medicine* Sep;65(3):461-71.
- Powars DR, Chan L, Schroeder WA (1989) The influence of fetal hemoglobin on the clinical expression of sickle cell anemia. *Ann N Y Acad Sci* 565: 262–78.
- Pruitt KD, Brown GR, Hiatt SM, Thibaud-Nissen F, Astashyn A, Ermolaeva O, Farrell CM, Hart J, Landrum MJ, McGarvey KM (2014) RefSeq: An update on mammalian reference sequences. *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue):D756-63.
- Rackoff WR, Kunkel N, Asakura T, Ohene-Frempong K (1993) Pulse oximetry and factors associated with hemoglobin oxygen desaturation in children with sickle cell disease. *Blood* 81(12):3422.
- Quinn CT, Rogers ZR, McCavit TL, Buchanan GR (2010) Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. *Blood*. Apr 29;115(17):3447-52.
- Quinn CT (2013) Sickle cell disease in childhood: from newborn screening through

- transition to adult medical care. *Pediatric clinics of North America*. Dec;60(6):1363-81.
- Quinn CT (2018) L-Glutamine for sickle cell anemia: more questions than answers. *Blood* 132(7):689–693.
- Rackoff WR, Kunkel N, Silber JH, Asakura T, Ohene-Frempong K (1993) Pulse oximetry and factors associated with hemoglobin oxygen desaturation in children with sickle cell disease. *Blood* 81(12):3422.
- Raghavachari N, Barb J, Yang Y, Liu P, Woodhouse K, Levy D, O'Donnell CJ, Munson PJ and Kato GJ (2012) A systematic comparison and evaluation of high density exon arrays and RNA-seq technology used to unravel the peripheral blood transcriptome of sickle cell disease. *BMC Med Genomics* 5:28.
- Rankine-Mullings AE, Morrison-Levy N, Soares D, Aldred K, King L, Ali S, Knight-Madden J, Wisdom-Phipps M, Adams RJ, Ware RE et al. (2018) Transcranial Doppler velocity among Jamaican children with sickle cell anaemia: determining the significance of haematological values and nutrition. *Br J Haematol* Apr;181(2):242-51.
- Rankine-Mullings A, Reid M, Soares D, Taylor-Bryan C, Wisdom-Phipps M, Aldred K, Latham T, Shultz WH, Knight-Madden J, Badaloo A et al. (2021) Hydroxycarbamide treatment reduces transcranial Doppler velocity in the absence of transfusion support in children with sickle cell anaemia, elevated transcranial Doppler velocity, and cerebral vasculopathy: the EXTEND trial. *Br J Haematol*. 195(4):612-620
- Rankine-Mullings AE, Nevitt SJ (2022) Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev* Sep 1;9(9):CD002202.
- Raphael JL, Shetty PB, Liu H, Mahoney DH, Mueller BU (2008) A critical assessment of transcranial doppler screening rates in a large pediatric sickle cell center: opportunities to improve healthcare quality. *Pediatr Blood Cancer* Nov;51(5):647-51.
- Rees DC, Dick MC, Height SE, O'Driscoll S, Pohl KR, Goss DE, Deane Cr (2008) A simple index using age, hemoglobin, and aspartate transaminase predicts increased intracerebral blood velocity as measured by transcranial Doppler scanning in children with sickle cell anemia. *Pediatrics* Jun;121(6):e1628-32.
- Rees DC, Lambert C, Cooper E, Bartram J, Goss D, Deane C, Deane C, Thein SL

- (2009) Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency is not associated with cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Blood* Jul 16;114(3):742-3; author reply 3-4.
- Rees DC, Williams TN, Gladwin MT (2010) Sickle-cell disease. *Lancet* Dec 11;376(9757):2018-31.
- Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE (2002) Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease, *Nat. Med.* 8:1383–1389.
- Rigano P, De FL, Sainati L, Piga A, Piel FB, Cappellini MD, Fidone C, Masera M, Palazzi G, Gianesin B et al. (2018) Real-life experience with hydroxyurea in sickle cell disease: A multicenter study in a cohort of patients with heterogeneous descent. *Blood Cells Mol Dis* Mar;69:82-9.
- Reggiani G, Coppadoro B, Munaretto V, Pieroni A, Viaro F, Manara R, Beaubrun A, Biffi A, Baracchini C, Sainati L, Colombatti R (2023) Relationship between hemoglobin, hemolysis, and transcranial Doppler velocities in children with sickle cell disease: Results from a long-term natural history study in Italy in the era of multimodal therapy. *Eur J Haematol* Sep;111(3):414-422.
- Roseff SD (2009) Sickle cell disease: a review. *Immunohematology / American Red Cross* 25(2):67-74.
- Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT (2005) The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* 293(13):1653–1662.
- Roversi F, Cunha A, Brugnerotto A, Carazzolle M, Albuquerque D, Lanaro C, Machado-Neto J, Saad S, Costa F (2013) Gene Expression Analysis of the Brazilian Type of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin: Identification of Genes that Could be Related to γ -Globin Activation. *Hemoglobin* 37:1–20.
- Rumaney MB, Ngo Bitoungui VJ, Vorster AA, Ramesar R, Kengne AP, Ngogang J, Wonkam A (2014) The co-inheritance of alpha-thalassemia and sickle cell anemia is associated with better hematological indices and lower consultations rate in Cameroonian patients and could improve their survival. *PLoS One* 9(6):e100516.
- Runge A, Brazel D, Pakbaz Z (2022) Stroke in sickle cell disease and the promise of recent disease modifying agents. *J Neurol Sci.* Nov 15;442:120412.
- Russell MO, Goldberg HI, Hodson A, Kim HC, Halus J, Reivich M, Schwartz E (1984) Effect of transfusion therapy on arteriographic abnormalities and on

recurrence of stroke in sickle cell disease. *Blood* 63:162-169.

- Salama K, Rady R, Hashem RH, El-Ghamrawy M (2020) Transcranial Doppler Velocities among Sickle Cell Disease Patients in Steady State Hemoglobin. *Nov*;44(6):418-422.
- Santiago RP, Guarda CC, Figueiredo CVB (2018) Serum haptoglobin and hemopexin levels are depleted in pediatric sickle cell disease patients. *Blood Cells Mol. Dis.* 72 34–36.
- Sankaran VG, Orkin SH (2013) The Switch from Fetal to Adult Hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1;3(1):a011643.
- Saraf SL, Molokie RE, Nouraie M, Sable CA, Luchtman-Jones L; Ensing GJ, Campbell AD, Rana SR, Niu XM, Machado RF, Gladwin MT, Gordeuk VR (2014) Differences in the clinical and genotypic presentation of sickle cell disease around the world. *Paediatr. Respir. Rev* 15, 4–12.
- Saraf SL, Akingbola TS, Shah BN, Ezekekwa CH, Sonubi O, Zhang X, Hsu LL, Gladwin MT, Machado RF, Kooper RS et al. (2017) Associations of alpha-thalassemia and BCL11A with stroke in Nigerian, United States, and United Kingdom sickle cell anemia cohorts. *Blood Adv* 1(11):693-698.
- Schaer, D.J.; Buehler, P.W (2013) Cell-free hemoglobin and its scavenger proteins: New disease models leading the way to targeted therapies. *Cold Spring Harb. Perspect. Med* 3, a013433.
- Schatz J, Brown RT, Pascual JM, Hsu L, DeBaun MR (2001) Poor school and cognitive functioning with silent cerebral infarcts and sickle cell disease. *Neurology* Apr 24;56(8):1109-11.
- Schmalzer EA, Lee JO, Brown AK, Usami S, Chien S (1987) Viscosity of mixtures of sickle and normal red cells at varying hematocrit levels. Implications for transfusion. *Transfusion* 27(3):228-233.
- Scothorn DJ, Price C, Schwartz D, Terrill C, Buchanan GR, Shurney W, Sarniak I, Fallo R, Chu JY, Pegellow CH et al. (2002) Risk of recurrent stroke in children with sickle cell disease receiving blood transfusion therapy for at least five years after initial stroke. *J Pediatr* 140:348-354.
- Scott RM, Smith JL, Robertson RL, Madsen JR, Soriano SG, Rockoff MA (2004) Long-term outcome in children with moyamoya syndrome after cranial revascularization by pial synangiosis. *J Neurosurg* 100:142-149.
- Sebastiani, P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT, Steinberg MH (2005) Genetic

- dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. *Nat Genet* Apr;37(4):435-40.
- Sebastiani P, Solovieff N, Hartley SW, Milton JN, Riva A, Dworkis DA, Melista E, Klings ES, Garrett ME, Telen MJ et al. (2010) Genetic modifiers of the severity of sickle cell anemia identified through a genome-wide association study. *Am J Hematol* 85(1):29-35.
- Sedrak A, Kondamudi NP (2021) Sickle Cell Disease. In StatPearls; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2021.4.
- Senet P, Blas-Chatelain C, Levy P, Manea EM, Peschanski M, Mirault T, Stankovic-Stojanovic K, Debure C, Debbache K, Girot R, Bureau JM, Bachmeyer C, Baldeschi C, Galacteros F, Lionnet F, Gellen-Dautremer J (2017) Factors predictive of leg-ulcer healing in sickle cell disease: a multicentre, prospective cohort study. *Br J Dermatol* Jul;177(1):206-211.
- Serjeant GR (2013) The natural history of sickle cell disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* Oct;3(10):a011783.
- Serjeant GR, Vichinsky E (2017) Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. *Blood Cells Mol Dis* 70:66-77.
- Shibayama N (2020) Allosteric transitions in hemoglobin revisited. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1864(2):129335.
- Shimauti ELT, Humberto Silva DG, Menezes de Souza E, Almeida EA, Leal FP, Bonini-Domingos CR (2015) Prevalence of β -globin gene haplotypes, α -thalassemia (3.7 kb deletion) and redox status in patients with sickle cell anemia in the state of Paraná, Brazil. *Genet Mol Biol* 323:316–323.
- Sickle Cell Disease: transcranial doppler coverage in Brazil from 2018 to 2020 http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_exame_ecodoppler_transcraniano.pdf.
- Silva CM, Giovani P, Viana MB (2011) High reticulocyte count is an independent risk factor for cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer* 56(1):116–121.904–1907.
- Silva LB, Gonçalves RP (2010) Características fenotípicas dos pacientes com anemia falciforme de acordo com os haplótipos do gene da β S-globina em Fortaleza, Ceará. *Rev Bras Hematol Hemoter* 32(1):40–44.
- Small KM, Brown KM, Theiss CT, Seman CA, Weiss ST, Liggett SB (2003) An Ile

to Met polymorphism in the catalytic domain of adenylyl cyclase type 9 confers reduced beta2-adrenergic receptor stimulation. *Pharmacogenetics* Sep;13(9):535-41.

Smith ER, McClain CD, Heeney M, Scott RM (2009) Pialsyn angiosis in patients with moyamoya syndrome and sickle cell anemia: perioperative management and surgical out come. *Neurosurg Focus* 26:E10.

Smith ER, Scott RM (2012) Spontaneous occlusion of the circle of Willis in children: pediatric moyamoya summary with propose devidence based practice guidelines. A review. *J Neurosurg Pediatr* 9:353-360.

Solomou E, Kraniotis P, Kourakli A, Petsas T (2013) Extent of silent cerebral infarcts in adult sickle-cell disease patients on magnetic resonance imaging: is there a correlation with the clinical severity of disease? *Hematol Rep* Jan 25;5(1):8-12.

Sommet J, Alberti C, Couque N, Verlhac S, Haouari Z, Mohamed D, François M, Missud F, Holvoet L, Elmaleh M et al. (2016) Clinical and haematological risk factors for cerebral macrovasculopathy in a sickle cell disease newborn cohort: a prospective study. *Br J Haematol* 172(6):966-977.

Sortica, DA, Buffon MP, Souza BM, Nicoletto BB, Santer A, Assmann TS, Crispim D, Canani LH (2015) Association between the ENPP1 K121Q polymorphism and risk of diabetic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, v. 10, n. 3, p. 1–13.

Steen RG, Miles MA, Helton KJ, Strawn S, Wang W, Xiong X, Mulhern RK (2003) Cognitive impairment in children with hemoglobin SS sickle cell disease: relationship to MR imaging findings and hematocrit. *AJNR Am J Neuroradiol* Mar;24(3):382-9.

Steen RG, Emudianughe T, Hankins GM, Wynn LW, Wang W, Xiong X, Helton K (2003) Brain imaging finding sin pediatric patients with sickle cell disease. *Radiology* 228:216-225.

Steen RG, Xiong X, Langston JW, Helton K (2003) Brain injury in children with sickle cell disease: prevalence and etiology. *Ann Neurol* 54:564-572.

Steinberg M.H., Hebbel RP (1983) Clinical diversity of sickle cell anemia: Genetic and cellular modulation of disease severity. *Am J Hematol* 14(4):405-16.

Steinberg MH (1999) Management of sickle cell disease. *N Engl J Med* Apr 1;340(13):1021-30.

- Steinberg MH, Adewoye AH (2006) Modifier genes and sickle cell anemia. *Curr Opin Hematol* May;13(3):131-6.
- Steinberg MH (2008) Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. *Sci World J* 8:1295–1324.
- Steinberg MH (2009) Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *The Scientific World Journal* 9:46-67.
- Steinberg MH, Sebastiani P (2012) Genetic modifiers of sickle cell disease. *Am J Hematol* 87(8):795-803.
- Steinberg MH, Chui DH, Dover GJ, Sebastiani P, Alsultan A (2014) Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? *Blood* Jan 23;123(4):481-5.
- Steinberg MH (2020a) Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood* 136:2392-2400.
- Steinberg MH (2020b) Fetal Hemoglobin in Sickle Hemoglobinopathies: High HbF Genotypes and Phenotypes. *J Clin Med* Nov 23;9(11):3782.
- Steinberg MH (2022) Fetal-like Hemoglobin in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med* Feb 17;386(7):689-691.
- Stella J, Buers I, van de Wetering K, Hohne W, Rutsch F, Nitschke Y (2016) Effects of Different Variants in the ENPP1 Gene on the Functional Properties of Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase Family Member 1. *Human Mutation*, v. 37, n. 11, p. 1190–1201.
- Stewart WM, Wethers D, Smith J, Steinberg M (1992) The cooperative study of sickle cell disease. Laboratory profile of sickle cell disease: a cross-sectional analysis. The cooperative study of sickle cell disease. *J Clin Epidemiol* 45(8):893–909.
- Stuart MJ, Nagel RL (2004) Sickle-cell disease. *Lancet* Oct 9;364(9442):1343-60.
- Sunahara RK, Taussig R (2002) Isoforms of Mammalian Adenylyl Cyclase: Multiplicities of Signaling. *Molecular Interventions*, vol. 2, no 3, junho, p. 168–84.
- Sundt P, Gladwin MT, Novelli EM (2019) Pathophysiology of sickle cell disease. *Annu Rev Pathol* 14:263-292.
- Swerdlow PS (2006) Red cell exchange in sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 48-53.
- Switzer JA, Hess DC, Nichols FT, Adams RJ (2006) Pathophysiology and treatment

of stroke in sickle-cell disease: present and future. *Lancet Neurol* Jun;5(6):501-12.

- Teixeira HMP, Alcantara-Neves NM, Barreto M, Figueiredo CA, Costa RS (2017) Adenylyl Cyclase Type 9 Gene Polymorphisms Are Associated with Asthma and Allergy in Brazilian Children. *Molecular Immunology*, vol. 82, Feb;82:137-145.
- Telfer PT, Evanson J, Butler P, Hemmaway C, Abdula C, Gadong N, Whitmarsh S, Kaya B, Kirkham FJ (2011) Cervical carotid artery disease in sickle cell anemia: clinical and radiological features. *Blood* 118:6192-6199.
- Tewari S, Brousse V, Piel FB, Menzel S (2015) Rees DC. Environmental determinants of severity in sickle cell disease. *Haematologica* Sep;100(9):1108-16.
- Thangarajh M, Yang G, Fuchs D, Ponisio MR, McKinstry RC, Jaju A, Noetzel MJ, Casella JF, Barron-Casella E, Hooper WC et al. (2012) Magnetic resonance angiography-defined intracranial vasculopathy is associated with silent cerebral infarcts and glucose-6 phosphate dehydrogenase mutation in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* Nov;159(3):352-9.
- Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C (2009) Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. *Human Molecular Genetics*, 18, R216– R223.
- Uda M, Galanello R, Sanna S, Lettre G, Sankaran VG, Chen W, Usala G, Busonero F, Maschio A, Albai G, Piras MG, Sestu N, Lai S, Dei M, Mulas A, Crisponi L, Naitza S, Asunis I, Deiana M, Nagaraja R, Perseu L, Satta S, Cipollina MD, Sollaino C, Moi P, Hirschhorn JN, Orkin SH, Abecasis GR, Schlessinger D, Cao A. (2008) Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:1620–1625.
- Václav L, Meynart BN, Mutsaerts HJMM (2019) Hemodynamic provocation with acetazolamide shows impaired cerebrovascular reserve in adults with sickle cell disease. *Haematologica* 104: 690–699.
- Van Beers EJ, Samsel L, Mendelsohn L, Sayed R, Fertrin KY, Brantner CA, Daniels MP, Nichols J, McCoe JP, Kato GF (2014) Imaging flow cytometry for automated detection of hypoxia-induced erythrocyte shape change in sickle cell disease. *Am J Hematol* 89(6):598–603.

- Van de Graaf SFJ, Hoenderop JGJ, Gkika D, Lamers J, Prenen J, Rescher U, Gerke V, Staub O, Nilius B, Bindles RJM (2003) Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J.* 22: 1478-1487.
- van der Land V, Mutsaerts HJ, Engelen, Heijboer H, Roest M, Hollestelle MJ, Koijpers TW, Nederkoom PJ, Cnossen MH, Majoie CBL et al. (2016) Risk factor analysis of cerebral white matter hyperintensities in children with sickle cell disease. *Br J Haematol* 172(2): 274-284.
- Vernet O, Montes JL, O'Gorman AM, Baruchel S, Farmer JP (1996) Encephaloduroarterio syn angiosis in a child with sickle cell anemia and moyamoya disease. *Pediatr Neurol* 14:226-230.
- Vichinsky EP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O, Nickerson B (1997) Acute chest syndrome in sickle cell disease: Clinical presentation and course. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 89(5):1787-92.
- Vichinsky E, Hoppe CC, Ataga KI, Ware RE, Nduba V, El-Beshlawy A, Hassab H, Achebe MM, Alkindi S, Brown RC et al. (2019) A phase 3 randomized trial of voxelotor in sickle cell disease. *N Engl J Med* 381(6):509–519.
- Vinjamur DS, Bauer DE, Orkin SH (2018) Recent progress in understanding and manipulating haemoglobin switching for the haemoglobinopathies. *Br J Haematol* 180(5):630-643.
- Vu C, Bush A, Choi S (2021) Reduced global cerebral oxygen metabolic rate in sickle cell disease and chronic anemias *Am. J. Hematol.* 96: 901–913.
- Xu J, Sankaran VG, Ni M, Menne TF, Puram R V, Kim W and Orkin SH (2010) Transcriptional silencing of γ -globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. *Genes Dev* 24:783–789.
- Yan, S, Huang ZH, Andrews RK, Tang WJ (1998) Conversion of forskolin-insensitive to forskolinsensitive (mouse-type IX) adenylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* 53, 182–187.
- Yang W, Xu R, Porras JL, Takemoto CM, Khalid S, Garzon-Muvdi T, Caplan JM, Colby GP, Coon AL, Tamargo Rj et al. (2017) Effective nesses of surgical revascularization for stroke prevention in pediatric patients with sickle cell disease and moyamoya syndrome. *J Neurosurg Pediatr* 20:232-238.
- Wagner SC, Castro SM de, Gonzalez TP, Santin AP, Zaleski CF, Azevedo LA, Dreau H, Henderson S, Old J, Hutz MH (2010) Neonatal Screening for

- Hemoglobinopathies: Results of a Public Health System in South Brazil. *Genet Test Mol Biomarkers* 14:565–569.
- Wali Y, Beshlawi I, Fawaz N, Alkhayat A, Zalabana M, Elshinawy M, Al-Kindi S, Al-Raws AHA, Klein C (2012) Coexistence of sickle cell disease and severe congenital neutropenia: first impressions can be deceiving. *Eur J Haematol* 89(3):245–249.
- Wang WC (2007) The pathophysiology, prevention, and treatment of stroke in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol* May;14(3):191-7.
- Wang W, Brown C, McNaull M, Rogers ZR, Barton M, Dua M, Hankins JS, Gossett JM, Richardson J, Porter JS et al. (2023) Intensive hydroxyurea dosing in very young children with sickle cell anemia. *Blood Adv* Sep 11;bloodadvances.2022009613.
- Ware RE and Aygun B (2009) Advances in the use of hydroxyurea. *Hematology* 2009:62–69.
- Ware RE, Davis BR, Schultz WH, Brown RC, Aygun B, Sarnaik S, Odame I, Fuh B, George A, Owen W et al. (2016) Hydroxycarbamide versus chronic transfusion for maintenance of transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia-TCD with transfusions changing to hydroxyurea (TWITCH): a multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet* (London, England). 387(10019): 661-67.
- Ware RE, Rees RC, Sarnaik SA, Iyer RV, Alvarez OA, Casella JF, Shulkin BL, Shalaby-Rana E, Strife CF, Miller JH et al. (2010) Renal function in infants with sickle cell anemia: Baseline data from the BABY HUG trial. *J Pediatr* 156(1):66-70 e1.
- Wayne AS, Schoenike SE, Pegelow CH (2000) Financial analysis of chronic transfusion for stroke prevention in sickle cell disease. *Blood* 96(7):2369–2372.
- Weatherall DJ (2010) The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden, *Blood* 115 4331–4336.
- Webb J, Kwiatkowski JL (2013) Stroke in patients with sickle cell disease. *Expert review of hematology* Jun;6(3):301-16.
- Williams NW, Thein SL (2018) *Annu Rev Genomics Hum Genet* August 31; 19: 113–147.
- Wishner BC, Ward KB, Lattman EE, Love WE (1975) Crystal structure of sickle cell

- deoxyhemoglobin S at 5 Å resolution. *J Mol Biol* 98(1):179-194.
- Wykes C, Rees DC (2011) The safety and efficacy of hydroxycarbamide in infants with sickle cell anemia. *Expert Rev Hematol*. Aug;4(4):407-9.
- Yousif TYE (2022) Impact of Abnormal Leukocyte Count in the Pathophysiology of Sickle Cell Anemia. *J Blood Med* Nov 16;13:673-679.
- Zago MA, Figueiredo MS, Ogo SH (1992) Bantu BS cluster hap- lotype predominates among Brazilian Blacks. *Am J Phys Anthropol* 298:295–298.
- Zago MA, Pinto ACS (2007) Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 29:207-14.
- Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM and Townes TM (2010) KLF1 regulates BCL11A expression and γ - to β -globin gene switching. *Nat Genet* 42:742–744. doi: 10.1038/ng.637.
- Zhu H, Fan X, Yu Z, Liu J, Murata Y, Lu J, Zhao S, Hajjar KA, Lo EH, Wang Z (2010) Annexin A2 combined with low-dose tPA improves thrombolytic therapy in a rat model of focal embolic stroke. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 30: 1137-1146.
- Zimmerman SA, Schultz WH, Burgett S, Mortier NA, Ware RE (2007) Hydroxyurea therapy lowers transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anemia. *Blood* 110(3):1043-1047.

9. ANEXO

Tabela suplementar 1- Resumo das estratégias terapêuticas empregadas para os pacientes com doença cerebrovascular.

Caso	Evento	Idade 1º evento (anos)	HU pré DCV	RTC pós DCV	HU pós DCV
1	AVC/DTC AR	6	Não	Sim	Sim
2	AVC	4	Não	Sim	Sim
3	DTC AR	4	Não	Sim	Sim
4	DTC AR	8	Não	Sim	Não
5	AVC/DTC AR	7	Sim	Sim	Sim
6	DTC AR	4	Não	Sim	Sim
7	DTC AR	4	Não	Sim	Sim
8	AVC/DTC AR	3	Sim	Sim	Sim
9	AVC	9	Não	Sim	Sim
10	DTC AR	2	Não	Sim	Sim
11	AVC/DTC AR	12	Sim	Sim	Sim
12	AVC	5	Não	Sim	Não
13	AVC	9	Sim	Sim	Não
14	DTC AR	2	Sim	Sim	Sim
15	DTC AR	4	Sim	Sim	Sim
16	AVC/DTC AR	1	Sim	Sim	Sim
17	DTC AR	8	Sim	Sim	Sim
18	AVC	4	Sim	Sim	Sim
19	DTC AR	6	Sim	Sim	Não
20	DTC AR	4	Sim	Sim	Sim
21	DTC AR	2	Sim	Sim	Sim
22	AVC	5	Não	Sim	Não
23	AVC/DTC AR	6	Sim	Sim	Sim
24	AVC/DTC AR	2	Sim	Sim	Sim
25	AVC	4	Sim	Sim	Sim
26	DTC AR	5	Sim	Sim	Sim
27	DTC AR	2	Sim	Sim	Sim
28	DTC AR	5	Sim	Não	Sim
29	AVC	1	Sim	Sim	Sim
30	DTC AR	2	Sim	Não	Sim
31	AVC	3	Não	Sim	Não
32	AVC	5	Sim	Sim	Sim
33	DTC AR	3	Sim	Sim	Sim
34	AVC/DTC AR	5	Não	Sim	Não
35	DTC AR	4	Não	Sim	Sim
36	DTC AR	8	Não	Sim	Sim
37	AVC/DTC AR	5	Não	Sim	Não
38	DTC AR	4	Sim	Sim	Sim
39	AVC/DTC AR	6	Não	Sim	Não

40	DTC AR	7	Não	Sim	Não
41	AVC	3	Não	Sim	Não
42	DTC AR	3	Não	Sim	Não
43	AVC/DTC AR	8	Não	Sim	Sim
44	DTC AR	3	Não	Sim	Não
45	AVC/DTC AR	3	Não	Sim	Sim
46	AVC	10	Não	Sim	Não
47	DTC AR	5	Não	Sim	Sim

AVC: Acidente vascular cerebral; DTC AR: Doppler transcraniano de alto risco; HU: Hidroxiureia; RTC: Regime de transfusão crônico.

10. CURRICULUM LATTES

Ana Cláudia Mendonça dos Anjos
Curriculum Vitae

Ana Cláudia Mendonça dos Anjos

Curriculum Vitae

Nome civil

Nome Ana Cláudia Mendonça dos Anjos

Dados pessoais

Nascimento 28/03/1967 - Recife/PE - Brasil
CPF 547.410.504-59

Formação acadêmica/titulação

- 2021** Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Investigação da associação de polimorfismos em genes candidatos com o risco de acidente vascular encefálico em coorte pediátrica com anemia falciforme
Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra
Co-orientador: Antonio Roberto Lucena de Araujo e Igor de Farias Domingos
- 1993 - 1995** Especialização - Residência médica .
Centro Infantil Investig Hematológicas Dr Domingos A Boldrini, CINHE, Brasil
Título: Oncohematologia Pediátrica
- 1991 - 1993** Especialização - Residência médica .
Hospital Infantil Cândido Fontoura, HICF, Brasil
Título: Pediatria
- 1985 - 1990** Graduação em Curso de Medicina.
Fundação de Ensino Superior de Pernambuco Faculdade de Ciências Médicas Pe, FESP*, Brasil
- 1994 - 1994** Aperfeiçoamento em Programa de Doença Falciforme Talassemia (Ago/Set).
Children's Hospital Oakland, CHILDREN'S HO, Estados Unidos
-

Formação complementar

- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Visita Técnica em Hematologia Pediátrica. (Carga horária: 40h).
Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini, BOLDRINI, Campinas, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em V Curso de Férias - HLA. (Carga horária: 20h).
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brasil
- 1997 - 1997** Curso de curta duração em Curso de Bioestatística. (Carga horária: 40h).
Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini, BOLDRINI, Campinas, Brasil

1992 - 1992	Curso de curta duração em Onco-Hematotologia. (Carga horária: 15h). Centro de Estudos Prof. Pedro Alcantara, CEPPA, Brasil
1986 - 1986	Extensão universitária em XV Curso de Férias de Hematologia. (Carga horária: 16h). Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Centro Infantil Investig Hematológicas Dr Domingos A Boldrini - CINHE

Vínculo institucional

1995 - Atual	Vínculo: Outro , Enquadramento funcional: Médica Assistente no Setor de Hematologia , Carga horária: 0, Regime: Parcial
---------------------	---

Atividades

10/2003 - Atual	Direção e Administração <i>Cargos ocupados:</i> <i>Coordenadoria do Serviço de Hematologia</i>
02/1998 - Atual	Especialização <i>Especificação:</i> <i>Docente da Hematologia</i>

2. Prefeitura Municipal de Campinas - P/CAMPINAS

Vínculo institucional

1998 - 1999	Vínculo: Médica Pediatra , Enquadramento funcional: Médica Pediatra em Posto de Saúde , Carga horária: 0, Regime: Parcial
--------------------	---

Atividades

1998 - 1999	Serviço Técnico Especializado <i>Especificação:</i> <i>Médica Pediatra em Posto de Saúde</i>
--------------------	--

3. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Vínculo institucional

1995 - 1997	Vínculo: Médica Assistente , Enquadramento funcional: Médica
--------------------	--

Pediatra, Regime: Parcial

Atividades

1995 - 1997 Serviço Técnico Especializado, Cipo
Especificação:
Médica Assistente

4. Hospital Infantil Cândido Fontoura - HICF

Vínculo institucional

1992 - 1994 Vínculo: Outro , Enquadramento funcional: Médica Pediatra no Pronto Socorro , Carga horária: 0, Regime: Parcial

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. 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; BEZERRA, MARCOS ANDRÉ CAVALCANTI

Alpha thalassemia, but not α -S-globin haplotypes, influence sickle cell anemia clinical outcome in a large, single-center Brazilian cohort. ANNALS OF HEMATOLOGY. , v.100, p.921 - 931, 2021.

2. BATISTA, JÉSSICA V. G. F.; PEREIRA-MARTINS, DIEGO A.; FALCÃO, DIEGO A.; DOMINGOS, IGOR F.; ARCANJO, GABRIELA S.; HATZLHOFER, BETÂNIA L.; WEINHÄUSER, ISABEL; BATISTA, THAIS H. C.; CARDOSO, PABLO R. G.; **DOS ANJOS, ANA C.**; HAZIN, MANUELA F.; PITTA, MAIRA G. R.; COSTA, FERNANDO F.; ARAUJO, ADERSON S.; LUCENA-ARAUJO, ANTONIO R.; BEZERRA, MARCOS A.

Association of KLOTTH polymorphisms with clinical complications of sickle cell anemia. ANNALS OF HEMATOLOGY. , v.100, p.1921 - 1927, 2021.

3. BATISTA, JÉSSICA V. G. F.; ARCANJO, GABRIELA S.; BATISTA, THAIS H. C.; SOBREIRA, MARCONDES J.; SANTANA, RODRIGO M.; DOMINGOS, IGOR F.; HATZLHOFER, BETÂNIA L.; FALCÃO, DIEGO A.; PEREIRA-MARTINS, DIEGO A.; OLIVEIRA, JÉSSICA M.; ARAUJO, AMANDA

S.; LARANJEIRA, LUANA P. M.; MEDEIROS, FERNANDA S.; ALBUQUERQUE, FLÁVIA P.; ALBUQUERQUE, DULCINÉIA M.; SANTOS, MAGNUN N.; HAZIN, MANUELA F.; **DOS ANJOS, ANA C.**; COSTA, FERNANDO F.; ARAUJO, ADERSON S.; LUCENA-ARAÚJO, ANTONIO R.; BEZERRA, MARCOS A.

Influence of UGT1A1 promoter polymorphism, α-thalassemia and βs haplotype in bilirubin levels and cholelithiasis in a large sickle cell anemia cohort. ANNALS OF HEMATOLOGY. , v.100, p.903 - 911, 2021.

4. DOMINGOS, IGOR F.; PEREIRA-MARTINS, DIEGO A.; BORGES-MEDEIROS, RAYSSA L.; FALCAO, DIEGO A.; HATZLHOFFER, BETANIA L.; BREWIN, JOHN N.; GARDNER, KATE; MENDONÇA, TACIANA F.; CAVALCANTI, MARIA S.; CUNHA, ANDERSON F.; **ANJOS, ANA C.**; RODRIGUES, EVANDRA S.; KASHIMA, SIMONE; CRUZ, PEDRO R.; MELO, MONICA B.; MENZEL, STEPHAN; ARAUJO, ADERSON S.; COSTA, FERNANDO F.; BEZERRA, MARCOS A.; LUCENA-ARAÚJO, ANTONIO R.

Evaluation of oxidative stress-related genetic variants for predicting stroke in patients with sickle cell anemia. JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES. , v.414, p.116839 - , 2020.

5. FARIAS, ISABELA CRISTINA CORDEIRO; MENDONÇA-BELMONT, TACIANA FURTADO; MOURA, PATRÍCIA MUNIZ MENDES FREIRE; DOMINGOS, IGOR FARIAS; FALCÃO, DIEGO ARRUDA; ARCANJO, GABRIELA SILVA; HATZLHOFFER, BETÂNIA LUCENA DOMINGUES; Ó, KLEYTON PALMEIRA DO; FARIAS, JOÃO VICTOR CORDEIRO; SILVA, ANDREIA SOARES DA; VASCONCELOS, LUYDSON RICHARDSON SILVA; ARAÚJO, ADERSON DA SILVA; **ANJOS, ANA CLÁUDIA MENDONÇA DOS**; LUCENA-ARAÚJO, ANTÔNIO ROBERTO; CAVALCANTI, MARIA DO SOCORRO DE MENDONÇA; BEZERRA, MARCOS ANDRÉ CAVALCANTI

MBL2 gene polymorphisms are not related to the occurrence of cerebrovascular disease in sickle cell anemia. RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT. , v.9, p.439974240 - , 2020.

6. BATISTA, THAIS HELENA CHAVES; SOBREIRA, MARCONDES JOSÉ DE VASCONCELOS COSTA; SANTANA, RODRIGO MARCIONILO DE; ARCANJO, GABRIELA DA SILVA; RAMOS, CAMILA MABEL DE ALBUQUERQUE; ALBUQUERQUE, DULCINÉIA MARTINS; ARAUJO, ADERSON DA SILVA; **ANJOS, ANA CLÁUDIA MENDEONÇA DOS**; COSTA, FERNANDO FERREIRA; LUCENA-ARAÚJO, ANTONIO ROBERTO; BEZERRA, MARCOS ANDRÉ CAVALCANTI

Interaction between hemoglobin S and N-Baltimore: a case report in Pernambuco, Brazil. Hematology, Transfusion and Cell Therapy. , v.41, p.365 - 368, 2019.

7. DOMINGOS, IGOR F.; PEREIRA-MARTINS, DIEGO A.; COELHO-SILVA, JUAN L.; BORGES-MEDEIROS, RAYSSA L.; FALCÃO, DIEGO A.; AZEVEDO, RENATA C.; **ANJOS, ANA C.**; COSTA, FERNANDO F.; MENDONÇA, TACIANA F.; CAVALCANTI, MARIA S.; ARAUJO, ADERSON S.; LUCENA-ARAÚJO, ANTONIO R.; BEZERRA, MARCOS A.

Interleukin-6 G-174C polymorphism predicts higher risk of stroke in sickle cell anaemia. BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY. , v.182, p.294 - 297, 2018.

8. FARIAS, ISABELA CRISTINA CORDEIRO; MENDONÇA-BELMONT, TACIANA FURTADO; SILVA, ANDREIA SOARES; DO Ó, KLEYTON PALMEIRA; FERREIRA, FELIPE BORBA; MEDEIROS, FERNANDA SILVA; VASCONCELOS, LUYDSON RICHARDSON SILVA; REGO, MOACYR JESUS BARRETO DE MELO; BEZERRA, MARCOS ANDRE CAVALCANTI; ARAUJO, ADERSON SILVA; MOURA, PATRÍCIA MUNIZ MENDES FREIRE; **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA**; HATZLHOFFER, BETÂNIA LUCENA DOMINGUES; CAVALCANTI, MARIA DO SOCORRO MENDONÇA

Association of the SOD2 polymorphism (Val6Ala) and SOD activity with vaso-occlusive crisis and acute splenic sequestration in children with sickle cell anemia. MEDITERRANEAN JOURNAL OF HEMATOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES. , v.10, p.e2018012 - , 2017.

9. MEDEIROS, FERNANDA SILVA; MENDONÇA, TACIANA FURTADO DE; LOPES, KATIUSCIA ARAÚJO DE MIRANDA; FRANÇA, LAÍS MEDEIROS DA CÂMARA; SILVA, ANDREIA SOARES DA; VASCONCELOS, LUYDSON RICHARDSON SILVA; OLIVEIRA, MARIA DO CARMO VALGUEIRO COSTA DE; **ANJOS, ANA CLÁUDIA MENDONÇA DOS**; HATZLHOFFER, BETÂNIA LUCENA DOMINGUES; BEZERRA, MARCOS ANDRÉ CAVALCANTI; ARAÚJO, ADERSON DA SILVA; MOURA, PATRÍCIA; CAVALCANTI, MARIA DO SOCORRO DE MENDONÇA

Combined genotypes of the MBL2 gene related to low mannose-binding lectin levels are associated with vaso-occlusive events in children with sickle cell anemia. *GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY.* , v.40, p.600 - 603, 2017.

10. MENDONÇA BELMONT, TACIANA FURTADO DE; DO Ó, KLEYTON PALMEIRA; SOARES DA SILVA, ANDREIA; DE MELO VILAR, KAMILA; SILVA MEDEIROS, FERNANDA; SILVA VASCONCELOS, LUYDSON RICHARDSON; **MENDONÇA DOS ANJOS, ANA CLAUDIA**; DOMINGUES HATZLHOFFER, BETÂNIA LUCENA; PITTA, MAÍRA GALDINO DA ROCHA; BEZERRA, MARCOS ANDRÉ CAVALCANTI; ARAÚJO, ADERSON DA SILVA; DE MELO REGO, MOACYR JESUS BARRETO; MOURA, PATRÍCIA; CAVALCANTI, MARIA DO SOCORRO MENDONÇA

Single Nucleotide Polymorphisms at +191 and +292 of Galectin-3 Gene (LGALS3) Related to Lower GAL-3 Serum Levels Are Associated with Frequent Respiratory Tract Infection and Vaso-Occlusive Crisis in Children with Sickle Cell Anemia. *PLoS One.* , v.11, p.e0162297 - , 2016.

11. LOBO, CLARISSE LOPES DE CASTRO; CANÇADO, RODOLFO DELFINI; LEITE, ANA CLAUDIA CELESTINO BEZERRA; **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**; PINTO, ANA CRISTINA SILVA; MATTA, ANDRE PALMA DA CUNHA; SILVA, CÉLIA MARIA; SILVA, GISELE SAMPAIO; FRIEDRISCH, JOÃO RICARDO; BRAGA, JOSEFINA APARECIDA PELLEGRINI; LANGE, MARCOS CHRISTIANO; FIGUEIREDO, MARIA STELLA; RUGANI, MARÍLIA ÁLVARES; VELOSO, ORLANDO; MOURA, PATRÍCIA GOMES; CORTEZ, PAULO IVO; ADAMS, ROBERT; GUALANDRO, SANDRA FÁTIMA MENOSI; CASTILHO, SHIRLEY LOPES DE; THOMÉ, URSULA; ZETOLA, VIVIANE FLUMIGNAN

Brazilian Guidelines for transcranial doppler in children and adolescents with sickle cell disease. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* , v.33, p.43 - 48, 2011.

12. **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**; PAULA, M J A; VALERA, E T; LOGGETO, S R; LATORRE, M R D O; CAPASSO, F S; MELO, L Niero; LOPES, L F

La epidemiologia en los síndromes mielodisplásicos en pediatría: resultado del Grupo Brasileño de Mielodisplasia.. *Revista Chilena de Cancerología e Hematología.* , v.13, p.161 - 173, 2003.

13. SANTOS, ALLAN; PINHEIRO, VITÓRIA; **ANJOS, ANA**; BRANDALISE, SÍLVIA; FAHEL, FERNANDA; LIMA, MARIANA; ETCHEBEHERE, ELBA; RAMOS, CELSO; CAMARGO, EDWALDO E.

Scintigraphic follow-up of the effects of therapy with hydroxyurea on splenic function in patients with sickle cell disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (Print).* , v.29, p.536 - 541, 2002.

14. **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**; ANDRADE, I M; LOPES, L F; MELO, L Niero; RIBEIRO, M F R

Pediatric secondary MDS in the Brazilian Working Group.. *Leukemia Research.* , v.25, p.523 - 581, 2001.

Capítulos de livros publicados

1. **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**

Diagnóstico Diferencial em Pediatria In: Neutropenia.3 ed.Rio de Janeiro: Editora Científica LTDA, 2013, p. 692-698.

2. **ANJOS, ANA CLÁUDIA MENDEONÇA DOS**; LOGGETTO, S. R.; BRAGA, J. A. P.; CAMOPANAR, C. M.; LYRA, I. M.; BORATO, M.; FIGUEIRA, C. M. G.; ARAUJO, P. I. C.

Doença Falciforme In: Doença Falciforme.1 ed.Recife: Atheneu, 2013, v.1, p. 139-164.

3. **ANJOS, ANA CLÁUDIA MENDEONÇA DOS**

Anemia Aplástica In: Anemia Aplástica.4 ed.Rio de Janeiro: Científica Ltda, 2011, v.1, p. 720-725.

4. **ANJOS, ANA CLÁUDIA MENDEONÇA DOS**; ARAUJO, F. M. R.; PERES, J. C.

Manifestações Hematológicas das Doenças Sistêmicas In: Manifestações Hematológicas das

Doenças Sistêmicas. 4 ed. Rio de Janeiro: Científica Ltda, 2011, v.1, p. 735-737.

5. **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**

Urgências em Doença Falciforme. In: Manual de Urgências e Emergências Pediátricas. ed.: Editora Revinter, 2004

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**; PAULA, M J A; VALERA, E T; LOGGETO, S R; LATORRE, M R D O; CAPASSO, F S; MELO, L Niero; LOPES, L F

La epidemiologia en las síndromes mielodisplásicas en pediatría: Resultado del grupo brasileño de mielodisplasia. In: III Congreso division interamericana Sociedad Internacional de Hematología. IN: Sociedad Chilena de Hematología, 2003, Chile.

, 2003.

2. **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**; PAULA, M J A; VALERA, E T; LOGGETO, S R; LATORRE, M R D O; CAPASSO, F S; MELO, L Niero; LOPES, L F

The epidemiology of pediatric myelodysplastic syndrome (MDS - PED): The experience of the Brazilian Cooperative Group (BCG - MDS - PED) In: III International Symposium on MDS in Childhood, 2003, Italia.

, 2003.

3. **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**; PINHEIRO, V R P; BOMEDIANO, V H; BRANDALISE, S R

Uso da hidroxiuréia (HU) em crianças e adolescentes com doença falciforme. In: XVI Congresso Nacional do Colégio Brasileiro de Hematologia, 1997

, 1997.

4. **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**; TRICTA, F; BRANDALISE, S R

The role of regular transfusion regime in acute splenic sequestration in sickle cell patients. In: 20th Annual meeting of the national sickle cell disease program, 1995, Boston.

, 1995.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BATISTA, J. V. G. F.; MARTINS, D. A. P.; DOMINGOS, I. F.; FALCAO, D. A.; HATZLHOFFER, B. L. D.; ARAUJO, A. S.; **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**; CALLADO, F. M. R. A.; ARAUJO, A. R. L.; BEZERRA, M. A. C.

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM KLOTHO COM O DESENVOLVIMENTO DE PRIAPISMO EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2015, São Paulo.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2015. v.37. p.35 - 35

2. HIRATA, O. A.; MEDEIROS, F. S.; LIMA, A. S. M.; **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**; ARAUJO, F. A. R.; HATZLHOFFER, B. L. D.; BEZERRA, M. A. C.; ARAUJO, A. S.

Polimorfismo G-463-A no gene da mieloperoxidase e sua associação com os quadros infecciosos em pacientes com anemia falciforme In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2012 - HEMO2012, 2012, Rio de Janeiro.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2012. v.34. p.145 - 145

3. HATZLHOFFER, B. L. D.; BEZERRA, M. A. C.; SANTOS, M. N. N.; PINTO, M. S. A. R.; LIMA, A. S. M.; MEDEIROS, F. S.; **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**; ARAUJO, F. A. R.; BANDEIRA, F. M. G. C.; ARAUJO, A. S.

Triagem neonatal de hemoglobinopatias: Nove anos de experiência do Hospital Hemope - Recife PE In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2010 - HEMO 2010, 2010, Recife.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2010. v.32. p.52 - 52

4. SANTOS, M. N. N.; BEZERRA, M. A. C.; HATZLHOFFER, B. L. D.; ALBUQUERQUE, D. M.; FERREIRA, C. B. C.; PINTO, M. S. A. R.; LOPES, K. E.; BEZERRA, I.; ARAUJO, F. A. R.; **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**; COSTA, F. F.; ARAUJO, A. S.

Caracterização dos Haplótipos do Cluster Beta dos Pacientes com Hemoglobinopatia SC em Pernambuco In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2008, 2008, São Paulo.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2008. v.30. p.30 - 30

5. BEZERRA, M. A. C.; FERREIRA, C. B. C.; HATZLHOFFER, B. L. D.; SANTOS, M. N. N.; ALBUQUERQUE, D. M.; **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**; BANDEIRA, F. M. G. C.; ARAUJO, F. A. R.; COSTA, F. F.; ARAUJO, A. S.

Determinação dos Haplótipos Beta S a Genótipo Alfa em Crianças com Anemia Falciforme Oriundas da Triagem Neonatal para Hemoglobinopatias de Pernambuco In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2007 - Hemo 2007, 2007, São Paulo.

Anais da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 2007. , 2007. v.29. p.56 - 56

6. BEZERRA, M. A. C.; MELLO, M. R. B.; FERREIRA, C. B. C.; HATZLHOFFER, B. L. D.; SANTOS, M. N. N.; ALBUQUERQUE, D. M.; **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**; BANDEIRA, F. M. G. C.; COSTA, F. F.; ARAUJO, A. S.

Identificação Molecular da Protrombina Mutante, Fator v de Leiden e Metileno-Tetrahidrofolato Redutase em Pacientes com Doença Falciforme Oriundos da Triagem Neonatal de Pernambuco In: IV Simpósio Internacional de Hemoglobinopatias, 2007, Rio de Janeiro.

Anais do IV Simpósio Internacional de Hemoglobinopatias. , 2007.

7. HATZLHOFFER, B. L. D.; BEZERRA, M. A. C.; FERREIRA, C. B. C.; SANTOS, M. N. N.; ARAUJO, F. A. R.; **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**; BANDEIRA, F. M. G. C.; ARAUJO, A. S.

Triagem Neonatal de Hemoglobinopatias: Seis Anos de Experiência Hospital HEMOPE - Recife / PE In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2007 - Hemo 2007, 2007, São Paulo.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 2007. , 2007. v.29. p.50 - 51

8. ARAUJO, N. M. V.; HATZLHOFFER, B. L. D.; BANDEIRA, F. M. G. C.; **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**; SENA, A. F.; BEZERRA, M. A. C.; SANTOS, M. N. N.; ARAUJO, A. S.

Condicionamento Físico e Respiratório em Crianças Portadores de Doenças Falciformes Oriundas da Triagem Neonatal para Hemoglobinopatias em Pernambuco. In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2006 - HEMO2006, 2006, Recife.

Anais da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 2006. , 2006. v.28. p.415 - 416

9. BEZERRA, M. A. C.; SANTOS, M. N. N.; HATZLHOFFER, B. L. D.; MELLO, M. R. B.; FERREIRA, C. B. C.; ASSIS, A. M.; **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**; BANDEIRA, F. M. G. C.; COSTA, F. F.; ARAUJO, A. S.

Haplótipos Beta S; Genótipo Alfa e Frequência do Genótipo UGT1A1 em Crianças com Anemia Falciforme Oriundas da Triagem Neonatal para Hemoglobinopatias em Pernambuco In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2006, 2006, Recife.

Anais da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 2006. , 2006. v.28. p.26 - 27

Demais produções bibliográficas

1. **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**

Pesquisa: Programa de triagem neonatal para doença falciforme.. Pesquisa. , 1996. (Outra produção bibliográfica)

2. **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**

Pesquisa: Protocolo prospectivo para uso de hidroxiuréia em crianças com doença falciforme.. Pesquisa. , 1996. (Outra produção bibliográfica)

3. **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**

Pesquisa: Características clínicas do aborto provocado.. Pesquisa. , 1987. (Outra produção bibliográfica)

4. **ANJOS, ANA CLAUDIA MENDONÇA DOS**

Pesquisa: Características epidemiológicas do aborto provocado.. Pesquisa. , 1987. (Outra produção bibliográfica)