

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

RAYSSA LEAL BORGES DE MEDEIROS

Avaliação da influência do polimorfismo IVS-14-1046 no gene *ANXA2* com o desenvolvimento do acidente vascular cerebral em pacientes pediátricos com anemia falciforme

**Recife
2017**

RAYSSA LEAL BORGES DE MEDEIROS

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO IVS-14-1046 NO GENE
ANXA2 COM O DESENVOLVIMENTO DO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL
EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em genética.

Orientador: Prof, Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Recife

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Medeiros, Rayssa Leal Borges de

Avaliação da influência do polimorfismo IVS-14-1046 no gene *ANXA2* com o desenvolvimento do acidente vascular cerebral em pacientes pediátricos com anemia falciforme / Rayssa Leal Borges de Medeiros. – 2017.

73 f. : il.

Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Anemia falciforme 2. Polimorfismo (genética) I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (orientador) II. Título.

616.152

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 095

RAYSSA LEAL BORGES DE MEDEIROS

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO IVS-14-1046 NO GENE
ANXA2 COM O DESENVOLVIMENTO DO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL
EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em genética.

Aprovada em: 21/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra/
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Aderson da Silva Araujo
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco

Dr. Will de Barros Pita
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Paula Sandrim Garcia
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho aos meus pais, Washington e Alessandra e ao meu companheiro de vida, Breno; a quem amo e admiro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pelo amparo, proteção, exercício da tolerância e por todas as bênçãos de amor que me proporciona através da família que me confiou.

Ao Grupo NHCL e especialmente ao meu orientador, Marcos André, que me acompanhou e incentivou meu crescimento desde o meu segundo período de graduação em biomedicina, oferecendo-me incentivos e também por todos os ensinamentos passados para mim que hoje se concretizam neste escrito.

À minha mãe por todo o esforço em me instruir em cada passo dado e pelo entendimento dos meus momentos de ausência física; a meu pai, que esteve presente e educou-me enquanto pôde e agora está contemplando a realização desse sonho de um lugar especial.

A Breno, que esteve presente quando as dificuldades e os problemas se multiplicam na estrada e prosseguiu corajosamente comigo e junto de mim; e pela paciência, incentivo e amor que não faltaram um minuto sequer.

À Mecejana e Paulina, pelo suporte e pela amizade de valor inestimável.

Aos meus amigos Anne Kelly e Jobson Ferraz, que mesmo distantes, participam dessa conquista junto a mim.

À UFPE e toda a equipe técnica e superior, Gabriela Guedes, Nadja Freire, Ana Carolina Medeiros e Aleide Melo, bem como todo o corpo docente desta universidade que colaboraram para a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro pelos dois anos de estudo.

Por fim, os meus mais sinceros agradecimentos a todos que, mesmo não sendo aqui listados, tiveram participação nessa conquista.

A educação é nosso passaporte para o futuro,
pois o amanhã pertence às pessoas que se
preparam para ele hoje.

Malcom X

RESUMO

A anemia falciforme (AF), doença caracterizada por vaso-oclusão e hemólise crônica, possui o acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico como complicação clínica mais debilitante que acomete principalmente crianças. Diante do acometimento vascular dessa manifestação, o gene *ANXA2* parece ser um modulador promissor tendo em vista a ação de sua proteína na fibrinólise. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi investigar a relação do polimorfismo IVS-14-1046 C>T (rs7163836) na *ANXA2* com o desenvolvimento do AVC isquêmico em pacientes pediátricos com AF. Nesse estudo, 196 pacientes foram incluídos e agrupados de acordo com a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral (Doppler transcraniano, DTC). A frequência deste polimorfismo a expressão gênica da *ANXA2* foi determinada utilizando a metodologia TaqMan®, sendo os achados associados com a frequência de AVC e a influência do polimorfismo na expressão do gene, respectivamente. Com uma taxa estimada de AVC em 10 anos de 15%, pacientes com genótipo TT possuem um risco quase 6 vezes maior de desenvolver AVC ($P=0,02$). Em contrapartida não houve associação entre este polimorfismo e o DTC ($P=0,308$); contudo, quando pacientes com DTC normal foram analisados separadamente, observou-se que indivíduos com genótipo variante apresentaram maior frequência de AVC (15%; $P=0,006$). Na análise do perfil de expressão do gene *ANXA2*, o polimorfismo não pareceu desregular os níveis de *ANXA2* nos pacientes ($P=0,42$). Em resumo, o genótipo variante (TT) do polimorfismo IVS-14-1046 C>T no gene *ANXA2* está associado com o desenvolvimento de AVC nos pacientes pediátricos com AF, porém, não parece influenciar na expressão gênica.

Palavras-chave: Acidente vascular cerebral isquêmico. Doppler transcraniano. Polimorfismo. *ANXA2*.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA), a disease characterized by vasoocclusion and chronic hemolysis, has the ischemic stroke as a debilitating complication mostly frequent in children. As a result of to the vascular involvement in this complication, the *ANXA2* gene shows up as a promising molecular modulator due of the role of the protein ANXA2 in fibrinolysis. Therefore, the main objective of this study, was to investigate the relation between the IVS-14-1046 C>T (rs7163836) polymorphism and the stroke development in peditrics patients with SCA. In our study, 196 patients were enrolled and grouped according cerebral blood-flow velocity (Transcranial Doppler, TCD). The frequency of this polymorphism and *ANXA2* expression was detected using TaqMan® assay. The results were associated with the stroke frequency and the influence of polymorphism in gene expression, respectively. With estimated 10-year stroke rate of 15%, patients with TT genotype had almost 6-fold higher risk of stroke development ($P=0,02$). In contrast, there was no association between the polymorphism and TCD ($P=0,308$); however, when patients with normal TCD were analyzed individually, was observed that individuals with variant genotype (TT) showed higher frequency of stroke (14%; $P=0,006$). In the expression profile of *ANXA2*, the IVS-14-1046 polymorphism does not seem to influence in *ANXA2* levels ($P=0,42$). In conclusion, the variant genotype (TT) of IVS-14-1046 C>T polymorphism in *ANXA2* gene is associated with development of ischemic stroke in children with sickle cell anemia, however, does not influences in genic expression.

Key words: Ischemic stroke. Transcranial Doppler. Polymorphism. ANXA2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME. MUTAÇÃO NA 6ª POSIÇÃO DA PROTEÍNA DA GLOBINA B, LEVANDO A FORMAÇÃO DE UMA HEMOGLOBINA VARIANTE, A HBS, QUE EM BAIXAS TENSÕES DE OXIGÊNIO, POLIMERIZA-SE. O POLÍMERO DE HBS DANIFICA O ERITRÓCITO, DIMINUINDO SUA VIDA ÚTIL (HEMÓLISE) E A BIODISPONIBILIDADE DO ÓXIDO NÍTRICO. AS HEMÁCIAS FALCIZADAS TAMBÉM PROMOVEM A VASO-OCCLUSÃO (STEINBERG, 2008).....20

FIGURA 2 - MODELO DE SOBREPOSIÇÃO DE SUB-FENÓTIPOS DA AF. SUGERE-SE QUE UM CONJUNTO DE COMPLICAÇÕES HEMOLÍTICO-ENDOTELIAIS ESTEJAM ASSOCIADAS A BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE HB E ALTOS NÍVEIS DE MARCADORES DE HEMÓLISE (LDH, RETICULÓCITOS) E QUE ESTES POSSAM INFLUENCIAR NO DESENVOLVIMENTO DE ÚLCERAS MALEOLARES, PRIAPISMO, HIPERTENSÃO PULMONAR E TALVEZ NO AVC-NÃO HEMORRÁGICO (KATO ET AL., 2007)..... 22

FIGURA 3 - DIAGRAMA DA ÁREA ONDE O TRANSDUTOR DO DOPPLER TRANSCRANIANO É POSICIONADO PARA OBTER OS SINAIS DAS ARTÉRIAS INTRACRANIANAS (AASLID ET AL. 1982).....25

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO COMPLEXO AIIT NA SUPERFÍCIE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS. É COMPOSTO POR DUAS MOLÉCULAS DE ANXA2 (EM ROXO) E DUAS MOLÉCULAS DA S10010A (EM VERDE). A LETRA K, DEMOSTRA O SÍTIO DE LIGAÇÃO PARA O PLASMINOGÊNIO E O TPA (MADUREIRA ET AL. 2013) (ADAPTADA).....30

FIGURA 5 - PROBABILIDADE CUMULATIVA PARA DESENVOLVIMENTO DE AVC EM PACIENTES COM AF DE ACORDO COM OS GENÓTIPOS PARA O POLIMORFISMO IVS-14-1046 C>T (RS7163836).....43

FIGURA 6 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE ANXA2 EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM AF COMPARADOS AOS TRÊS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROTOCOLO PADRÃO DE CONDIÇÃO DE REAÇÃO DA TAQMAN® PARA AMPLIFICAÇÃO POR QPCR.....	36
TABELA 2 - PROTOCOLO PADRÃO DE CONDIÇÃO DE REAÇÃO DE SONDAS DE HIDRÓLISE (TAQMAN®) PARA A REAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	37
TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM AF DE ACORDO COM O POLIMORFISMO IVS-14-1046 C>T NO GENE ANXA2.....	41
TABELA 4 - FREQUÊNCIA OBSERVADA DO SNP, DE ACORDO COM O MODELO CODOMINANTE, EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM AF E DE ACORDO COM O RESULTADO DO DTC.....	41
TABELA 5 - VARIÁVEIS RELACIONADAS AO DESENVOLVIMENTO DE AVC EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM AF DE ACORDO COM O POLIMORFISMO IVS-14-1046 NO GENE ANXA2.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	- Porcentagem
α	- Alfa
β	- Beta
μL	- Microlitro
cm/s	- Centímetros por segundo
dL	- Decilitro
GAPDH	- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
g	- Grama
K	- Potássio
kDa	- QuiloDaltons
L	- Litro
mg	- Miligrama
MgCl_2	- Cloreto de magnésio
mL	- Mililitro
mM	- Milimolar
M	- Molar
n/no	- Número
Na	- Sódio
P	- Significância
pH	- Potencial hidrogeniônico
q	- Braço longo do cromossomo
U	- Unidades
$^{\circ}\text{C}$	- Graus Célsius
=	- Igual a
>	- Maior que
\geq	- Maior ou igual a
<	- Menor que
A	- Adenina
AF	- Anemia falciforme
Allt	- Complexo anexina A2 heterotretâmero
AIT	- Ataque isquêmico transitório

ANXA2	- Proteína anexina A2
ANXA2	- Gene Anexina A2
AVC	- Acidente vascular cerebral
BEN	- Benim
C	- Citosina
CAR	- República centro-africana
CAM	- Camarões
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
CEU	- Utah residents with Northern and Western European Ancestry
cDNA	- DNA complementar
CNS	- Conselho Nacional de Saúde
DNA	- Ácido desoxirribonucleotídeo
DTC	- Doppler Transcraniano
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetracético
G	- Guanina
HbA	- Hemoglobina A
Hb	- Hemoglobina
<i>HBB</i>	- Gene da hemoglobina subunidade β
HbF	- Hemoglobina Fetal
HR	- Hazard ratio
HbS	- Hemoglobina S
HEMOPE	- Hospital de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HU	- Hidroxiuréia
IC	- Intervalo de confiança
IVS	- Intronic variation sequence
LabCen	- Laboratório Central
MAF	- Minimum allelic frequency
mRNA	- Ácido ribonucleico mensageiro
NO	- Óxido nítrico
OR	- Odds Ratio
PDF	- Produtos de degradação de fibrina
PH	- Regressão proporcional de <i>Hazard</i>
PRES	- Síndrome da Encefalopatia Posterior Reversível

qPCR	- Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	- Ácido ribonucleico
SAU	- Saudi-árabe
SEN	- Senegal
SNP	- Polimorfismo de nucleotídeo único
STA	- Síndrome torácica aguda
STOP	- Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia
SWITCH	- Stroke with Transfusions Changing to Hydroxyurea
T	- Timina
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido
tPA	- Ativador do plasminogênio tipo-tecidual
UNILAB	- Unidade de Laboratórios Especializados
UFPE	- Universidade Federal de Pernambuco
uPA	- Ativador do plasminogênio tipo-uroquinase
uPAR	- Receptor do ativador do plasminogênio tipo-uroquinase
VMMF	- Média da velocidade máxima de fluxo

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 ANEMIA FALCIFORME.....	19
2.1.1 Hemólise	21
2.2 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL.....	22
2.3 DOPPLER TRANSCRANIANO	24
2.4 PREVENÇÃO	26
2.4.1 Transfusão	26
2.4.2 Hidroxiuréia	27
2.5 PANORAMA GENÔMICO E PERSPECTIVAS MOLECULARES PARA PREVENÇÃO DO AVC EM PACIENTES COM AF.....	28
2.6 ANEXINA A2	29
2.6.1 Papel da anexina A2 na fibrinólise	30
2.6.2 Polimorfismo IVS-14-1046 no gene ANXA2	31
3. OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 CASUÍSTICA.....	34
4.2 CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS	35
4.3 ANÁLISE MOLECULAR	35
4.3.1 Extração do dna genômico para genotipagem	35
4.3.2 Genotipagem do polimorfismo IVS-14-1046	35
4.3.3 Extração de mRNA para expressão gênica	36
4.3.4 Síntese de cDNA e expressão gênica da ANXA2	36
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5. RESULTADOS	39
5.1 DESCRIÇÃO DA COORTE.....	39
5.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO IVS-14- 1046 C>T (RS7163836)	39

5.3 ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO IVS-14-1046 C>T E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM AF	40
5.4 DESFECHO CLÍNICO DOS PACIENTES COM AF DE ACORDO COM O POLIMORFISMO IVS-14-1046 C>T NO GENE ANXA2	42
5.5 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA COM O POLIMORFISMO IVS-14-1046 C>T (RS7163836)	43
5.6 ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO COM FATORES DE RISCO PARA DESENVOLVIMENTO DO AVC.....	44
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXO I – PARECER SUBSTANCIADO DO CEP	62
TABELA SUPLEMENTAR I.....	63
APÊNDICE A – TCLE MENORES DE 12 a 17 ANOS.....	64
APÊNDICE B – TCLE MENORES DE 18 ANOS.....	66
CURRICULUM VITAE (LATTES)	68

1 INTRODUÇÃO

Anemia falciforme (AF) é uma doença monogênica hereditária caracterizada por um curso clínico heterogêneo, influenciado não apenas por características genéticas inerentes à doença, mas também por fatores ambientais, sociais e econômicos. As manifestações clínicas dos pacientes com AF ocorrem principalmente em resposta à falcização intravascular das hemácias, à hemólise, e leucocitose, bem como à associação entre hemácias falcizadas e outros componentes do sangue. Em conjunto, esses fatores levam à oclusão vascular e eventos relacionados, que em última análise, refletem-se em crises de dor, úlceras de perna, priapismo, síndrome torácica aguda, osteonecrose e acidente vascular cerebral (AVC).

Várias evidências apontam o AVC como a manifestação clínica mais grave na AF, representando cerca de 20% da mortalidade em adultos e crianças. Atualmente, o Doppler transcraniano (DTC) (método não-invasivo que avalia as velocidades de fluxo sanguíneo nas artérias intracranianas), é considerada a ferramenta clínica de escolha para a estratificação prognóstica e prevenção primária do AVC em pacientes com AF. Apesar de sua inegável importância, o programa de triagem utilizando o DTC é restrito às crianças (de dois até 16 anos), não estando disponíveis em todos centros de referência de países em desenvolvimento e com a capacidade de atendimento limitada. Além disso, o DTC apresenta algumas limitações relacionadas à técnica, como sensibilidade limitada na identificação de indivíduos com risco de AVC com idade mais avançada (devido ao espessamento dos ossos do crânio).

Existem evidências suficientes na literatura que apoiam a ideia de que variantes genéticas específicas podem contribuir para o desenvolvimento de doença cerebrovascular na AF. Vários estudos identificaram associação entre polimorfismo de nucleotídeo único, SNP, (do inglês, *single nucleotide polymorphism*, SNP) e o desenvolvimento de AVC em pacientes com AF. Estes achados, juntamente com as limitações do DTC, ressaltam a importância de estudos mais aprofundados sobre a potencial associação de variantes genéticas específicas e o desenvolvimento do AVC pacientes com AF.

Neste contexto, a investigação no gene *ANXA2* é promissora na busca de alterações na homeostase vascular de pacientes com AF, devido ao seu papel indispensável na via fibrinolítica. Uma vez alterada, essa via perde, em parte, a sua capacidade de desfazer o coágulo de fibrina intravascular, podendo favorecer a obstrução de vasos cerebrais e provocando isquemia e infarto tecidual – o AVC.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANEMIA FALCIFORME

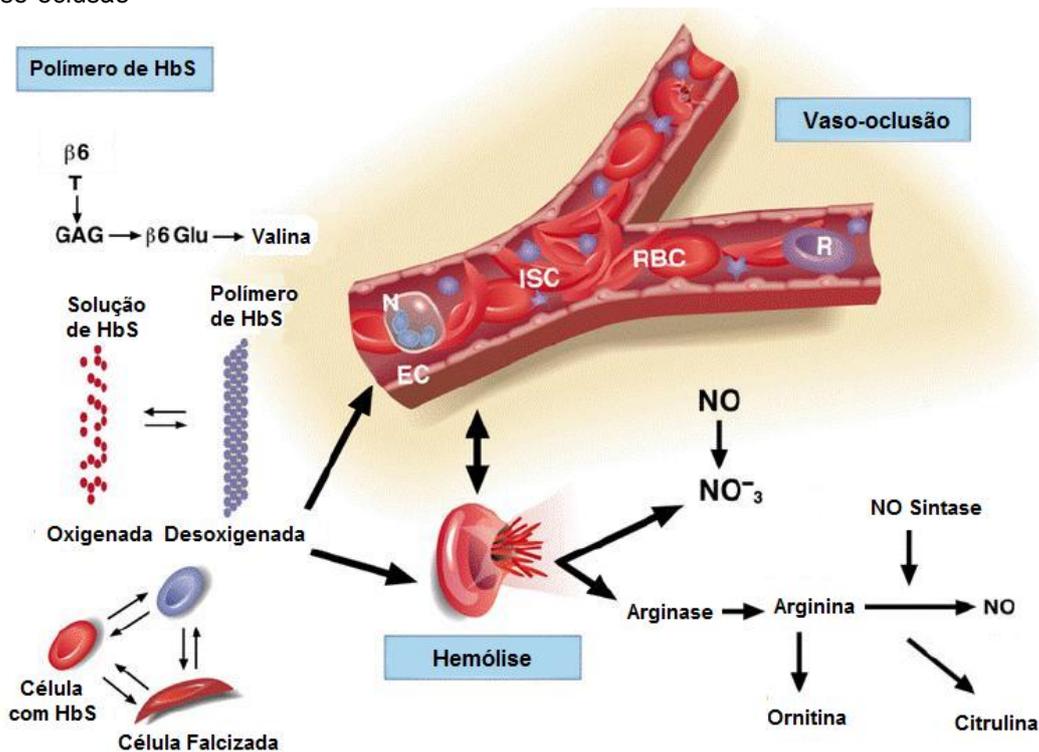
A anemia falciforme (AF) (homozigoze para hemoglobina (Hb) S) é considerada a doença monogênica mais comum no Mundo (Rusanova et al. 2011). No Brasil, estimando-se que de 3 a 6% da população brasileira possua o alelo variante β^S e que 700 a 1000 novos casos sejam diagnosticados todo ano (Lyra et al. 2005; Bezerra et al. 2007; Cançado and Jesus 2007; Bandeira et al. 2008). Em Pernambuco, um a cada 1400 nascidos vivos possuem a doença falciforme (HbS em heterozigose com outra Hb variante) (Cançado and Jesus 2007).

A AF, doença autossômica recessiva, é uma hemoglobinopatia causada por uma mutação pontual no gene da globina β (*HBB*), que promove a transversão da adenina pela timina (Steinberg 2008). Essa alteração de bases nitrogenadas provoca a substituição do ácido glutâmico pela valina na 6ª posição da proteína da cadeia β globínica (*HBB*; $\beta 6$ GAG-GTG; glu6→val6; rs334), levando a formação de uma hemoglobina variante (HbS) que, dependendo do padrão de herança genética (heterozigoto ou homozigoto mutado), pode substituir parcial ou completamente a hemoglobina normal (HbA) (Steinberg 2008; Ware et al. 2017). Quando desoxigenada, sob pH baixo e baixas concentrações de hemoglobina fetal (HbF), a HbS interage hidrofobicamente com outras moléculas de HbS formando polímeros que se depositam na membrana das hemácias, alterando sua forma de disco bicôncavo para um formato semelhante a uma foice (hemácia falcizada ou falciforme) (Figura 1) (Stuart and Nagel 2004).

A deformação dos eritrócitos altera a funcionalidade da bomba de Na^+/K^+ , com a perda de potássio e água, tornando os eritrócitos mais densos e favorecendo o aumento de polímeros de HbS intracelular (Gibson and Ellory 2002). O acúmulo de polímeros de HbS dentro do eritrócito danifica a membrana celular constantemente e favorece a hemólise intravascular. Além disso, o processo de falcização das hemácias altera as propriedades físicas da membrana plasmática, resultando em uma diminuição de sua flexibilidade e aumento considerável da taxa de adesão dessas células ao endotélio vascular

(principalmente na microcirculação) acarretando o processo de vaso-oclusão (Steinberg 2008).

Figura 1 - Fisiopatologia da anemia falciforme. Muta  o na 6^a posi  o da proteína da globina β , levando a forma  o de uma hemoglobina variante, a HbS, que em baixas tensões de oxig  nio, polimeriza-se. O polímero de HbS danifica o eritrócito, diminuindo sua vida útil (hemólise) e diminuindo a biodisponibilidade do óxido nítrico. As hemácias falcizadas também promovem a vaso-oclusão



Fonte: Steinberg (2008)

A ocorrência desses dois eventos (hemólise intravascular e processos vaso-oclusivos) tem um papel determinante no desenvolvimento dos principais sinais e sintomas clínicos dos pacientes com AF. Porém, as manifesta  es clínicas podem variar significativamente de um indivíduo para outro; desde pacientes sem muitas intercorrências clínicas àqueles com múltiplos eventos; tais como crises vaso-oclusivas, sequestro espl  nico, úlceras de membros inferiores, síndrome torácica aguda (STA), necrose asséptica de fêmur e/ou   mero, insuficiência renal cr  nica, priapismo, retinopatia, acidente vascular cerebral (Ballas and Mohandas 1996; Archer et al. 2015). Vários estudos suportam a ideia de que a modula  o fenotípica dessas manifesta  es clínicas entre indivíduos com AF esteja intimamente relacionada com fatores genéticos específicos (Martinez-Castaldi et al. 2007; Taylor et al. 2009; Flanagan et al. 2011)

O haplótipo do gene da globina β^S , a co-herança com α -talassemia, níveis elevados de Hb fetal (HbF) e a persistência hereditária da HbF (PHHF) foram relacionados como moduladores genéticos que influenciam no fenótipo de indivíduos com AF (Higgs et al. 1982; el-Hazmi et al. 1999; Sheehan et al. 2013; Domingos et al. 2014). Os haplótipos β^S apresentam correlação com os níveis de HbF presentes nesses pacientes, uma vez que a HbF não participa do polímero com a HbS; fato este que favorece bom curso clínico dos pacientes com altos níveis de HbF ou com PHHF (Steinberg 2008; Mahmoud et al. 2015). Dentre os cinco haplótipos existentes (CAR, BEN, SAU, CAM e SEN) aquele com menores níveis de HbF (CAR) cursam com clínica mais grave comparados àqueles com níveis intermediários e/ou altos, ou não-CAR, (BEN, SAU, CAM e SEN) (Alsultan et al. 2011). A co-herança da α -talassemia com a AF promove redução de Hb intracelular, incluindo a HbS, levando a uma menor polimerização e conseqüente menor taxa de hemólise (de Ceulaer et al. 1983). Essa redução na hemólise faz com que os pacientes cursem com menos complicações de caráter hemolítico (Kato et al. 2007; Domingos et al. 2014).

2.1.1 Hemólise

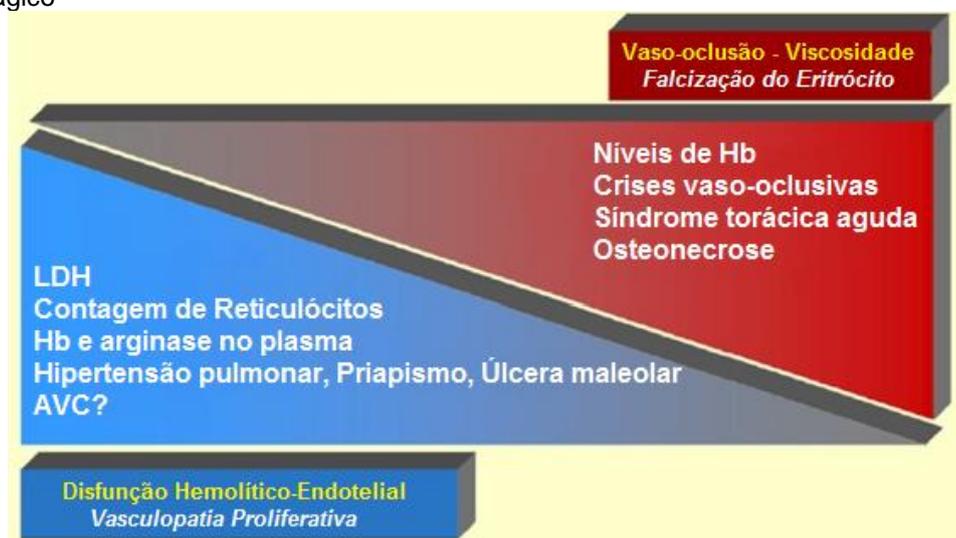
Enquanto que a mutação genética responsável pela AF ($\beta 6$ GAG-GTG; glu6 \rightarrow val6; rs334) é conhecida e bem estabelecida, os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela variação fenotípica entre os pacientes ainda não foram completamente elucidados (Ingram 1957; Connes et al. 2016). Apesar de os eventos hemolíticos e vaso-oclusivos frequentemente se sobreporem, o fenótipo hemolítico intravascular na AF, caracterizado pela alta taxa de hemólise (rompimento) das hemácias, promove uma disfunção na homeostase tanto na microcirculação como também na macrocirculação desses pacientes (Kato et al. 2007; Connes et al. 2016).

Como conseqüência da hemólise intravascular, ocorre a liberação do conteúdo eritróide para o plasma, especialmente Hb, que devido a cronicidade hemolítica da doença, promove a saturação de sua proteína ligante, a haptoglobina (Kato et al. 2007; Steinberg 2008). Uma vez livre na circulação, as moléculas de Hbs que não se ligaram às moléculas de haptoglobinas reagem

rapidamente com o óxido nítrico (NO) promovendo uma diminuição de sua biodisponibilidade (Reiter et al. 2002). A reação entre a Hb e o NO limita a difusão do NO do endotélio para o músculo liso, inibindo a vasodilatação (Pohl and Lamontagne 1991). Além disso, a hemácia lisada libera arginase, que por sua vez reduz a disponibilidade da L-arginina, principal substrato para a síntese de NO, sendo este outro mecanismo de diminuição de NO na circulação (Morris et al. 2005).

A baixa concentração de NO, por sua vez, promove a ativação e agregação de plaquetas e ativação da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (Minnecci et al. 2005). Em resumo, alterações biológicas no ciclo do NO parecem estar envolvidas no desenvolvimento de doenças cerebrovasculares, como a vasculopatia cerebral, infarto silencioso e acidente vascular isquêmico (Figura 2) (Bernaudin et al. 2008; DeBaun et al. 2012; Connes et al. 2013).

Figura 2 - Modelo de sobreposição de sub-fenótipos da AF. Sugere-se que um conjunto de complicações hemolítico-endoteliais estejam associadas a baixas concentrações de Hb e altos níveis de marcadores de hemólise (LDH, reticulócitos) e que estes possam influenciar no desenvolvimento de úlceras maleolares, priapismo, hipertensão pulmonar e talvez no AVC-não hemorrágico



Fonte: Kato et al.(2007)

2.2 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

De todas as manifestações clínicas observadas em pacientes com AF, o acidente vascular cerebral (AVC) representava, anteriormente às condutas de prevenção, aquela de maior impacto na vida dos pacientes, representando cerca de 20% da mortalidade em pacientes com AF (Stockman et al. 1972; Adams et al. 1998a). Apesar do AVC isquêmico e hemorrágico acometem pacientes com AF, estudos de 1970 a 2010 apontaram o isquêmico como o tipo de AVC mais prevalente em crianças e adultos com AF (aproximadamente 75% dos casos) (Wood 1978; Powars et al. 1978; Strouse et al. 2011).

O AVC isquêmico é comumente descrito como um evento neurológico agudo, secundário à estenose e oclusão de artérias cerebrais, resultando em isquemia tecidual e levando a manifestação de sinais e sintomas neurológicos por pelo menos 24 horas (Ohene-Frempong et al. 1998). Em pacientes com AF, o AVC isquêmico ocorre geralmente nas grandes artérias do polígono de Willis, onde as artérias cerebrais médias, cerebrais anteriores e carótida interna estão frequentemente associadas a esse desfecho (Stockman et al. 1972; Switzer et al. 2006).

Crianças com AF possuem um risco 300 vezes maior de desenvolver um AVC, fazendo da AF a causa mais comum de AVC na infância (Hoppe et al. 2007). Isoladamente, o AVC é responsável por 20% dos óbitos de crianças com AF entre 5-10 anos; adicionalmente, 70% dessas crianças que desenvolvem o AVC apresentam déficit motor e significativo déficit neurocognitivo (Ohene-Frempong et al. 1998; Zhou et al. 2011).

Clinicamente, esses pacientes podem ser identificados por hemiparesia, monoparesia, afasia, perda de força, convulsão, distúrbios visuais (Ohene-Frempong 1991; Connes et al. 2013). Entretanto, apenas características físico-motoras não são suficientes para a conclusão do diagnóstico de AVC. Alguns distúrbios neurológicos como Paralisia de Bell (paralisia facial periférica) e a Síndrome da Encefalopatia Posterior Reversível (PRES) por apresentarem características semelhantes, podem levar ao diagnóstico equivocado (Mayhew and Carhart 2015; Solh et al. 2016). Para que a hipótese diagnóstica seja confirmada é necessário que exames de imagem intracraniana como a ressonância magnética nuclear (RMN) ou tomografia computadorizada (TC), sejam realizados (Connes et al. 2013).

Apesar de o AVC isquêmico possuir alta prevalência, principalmente entre crianças com AF, pouco se sabe ainda sobre o mecanismo fisiopatológico de seu desenvolvimento (Switzer et al. 2006; Ware et al. 2017). Alguns fatores são apontados como moduladores do risco para o desenvolvimento do AVC isquêmico nos pacientes com AF: histórico de ataque isquêmico transitório, baixos níveis de hemoglobina basal (geralmente inferiores a 7 g/dL), episódios de STA e comprometimento do débito cardíaco (Ohene-Frempong et al. 1998). Com relação aos pacientes adultos, cuidados adicionais devem ser levados em consideração quanto ao risco para o desenvolvimento de AVC, tais como: perfil lipídico, diabetes melito, tabagismo e uso abusivo de drogas, como o álcool (Connes et al. 2013).

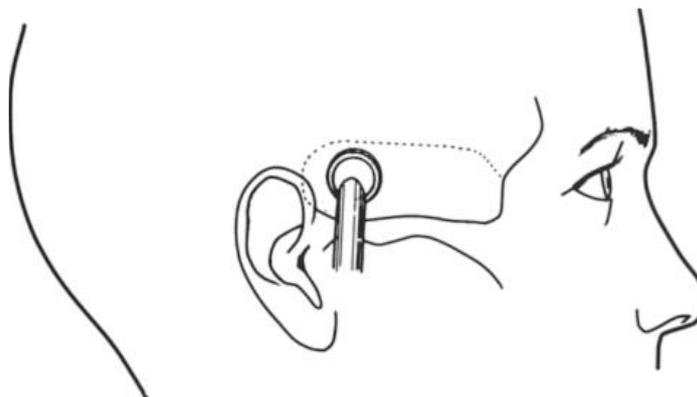
2.3 DOPPLER TRANSCRANIANO

Em 1998, Adams e cols. (Adams et al. 1998a) propuseram, através do STOP (do inglês, *Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia, STOP trial*), a utilização do Doppler Transcraniano (DTC) como ferramenta de triagem e estratificação clínica para a prevenção primária ao AVC em crianças, sendo possível a identificação de pacientes com risco elevado para o desenvolvimento desta manifestação. Esta triagem consiste de um exame por ultrassonografia não invasivo, indolor e de baixo custo, capaz de estimar a média da velocidade máxima de fluxo (VMMF) sanguíneo nas artérias intracranianas do polígono de Willis (Aaslid et al. 1982; Adams et al. 1998a).

Áreas de estenose são identificadas no DTC pelo aumento do fluxo sanguíneo, resultante do estreitamento dos vasos, uma vez que a velocidade é diretamente proporcional à velocidade cerebral sanguínea e indiretamente proporcional ao diâmetro do vaso (Adams 2014). O acesso a essas artérias é obtido por meio de um transdutor em uma região craniana de baixa densidade óssea ou em um forame ósseo. A via mais usual é a ultrassonográfica temporal que está localizada acima do arco zigomático e anterior à orelha (janela acústica) (Figura 3) (Aaslid et al. 1982). É possível, por essa via, avaliar a VMMF das artérias: cerebral média, bifurcação da artéria carótida interna, carótida interna, cerebral anterior e cerebral posterior, estas sempre avaliadas de modo bilateral.

Além dessas artérias, a artéria basilar também é avaliada (Adams et al. 1992; Adams et al. 1998a).

Figura 3 - Diagrama da área onde o transdutor do Doppler Transcraniano é posicionado para obter os sinais das artérias intracranianas



Fonte: Aaslid et al. (1982)

Pacientes com AF possuem o fluxo sanguíneo cerebral maior que pessoas sem a doença, devido a anemia (Herold et al. 1986; Prohovnik et al. 1989; Hurler-Jensen et al. 1994). Porém, não existe diferença do consumo médio de oxigênio comparativamente entre o grupo de indivíduos com e sem AF, sugerindo que o aumento de fluxo sanguíneo se torna um mecanismo compensatório (Herold et al. 1986).

Pacientes submetidos a este exame podem ser classificados em três grupos distintos: normal, condicionante e alto risco. A VMMF é considerada normal até 170 cm/s, condicionante quando a VMMF é igual ou superior a 170 cm/s até 199 cm/s, e alto risco, quando em duas avaliações seguidas e independentes, as VMMF são iguais ou superiores a 200 cm/s. Em pacientes que não são obtidas as velocidades nas artérias cerebrais médias e nas bifurcações, e o exame não for de boa qualidade, o DTC é considerado inadequado (Adams et al. 1998a).

É importante destacar que a avaliação do DTC é mais efetiva quando realizada em indivíduos até os 16 anos, devido à presença de ossos cranianos mais finos e janelas acústicas maiores (Adams et al. 1998a). Por limitação técnica, aproximadamente 5% das crianças apresentam DTC inadequado, por

não se conseguir mensurar o fluxo sanguíneo nas principais artérias (Adams 2004; Hoppe 2005).

Com base nesta classificação, os pacientes alocados no grupo normal, passam por avaliação pelo DTC de modo anual, enquanto que pacientes alocados nos grupos condicionante e alto risco precisam ser acompanhados a cada seis meses, e trimestralmente, respectivamente (Adams et al. 1998a). De acordo com Adams e cols., (Adams et al. 1992) crianças com AF e com DTC de alto risco, apresentam um risco 44 vezes maior de desenvolver AVC que pacientes com de AF com e DTC normal.

Entretanto, o valor de 200 cm/s não é absoluto, visto que pacientes que apresentam DTC em faixa condicionante também apresentam um elevado risco de desenvolver AVC e cerca de 19% das crianças com DTC normal também podem vir a desenvolver AVC (Adams et al. 1992; Adams et al. 1997; Adams 2004). Com base nessa classificação, os pacientes podem submetidos a esquemas profiláticos de transfusões periódicas e/ou protocolos terapêuticos.

2.4 PREVENÇÃO

2.4.1 Transfusão

A transfusão periódica e contínua, com intervalos de 21 a 28 dias, é utilizada nos pacientes com AF (com o objetivo de evitar complicações cerebrovasculares) tanto como profilaxia primária ao AVC quanto para reduzir a ocorrência de um novo evento (Mack and Thompson 2016).

Dessa forma, a identificação de altas velocidades através do DTC tornou-se clinicamente importante para que houvesse a chance de oferecer a prevenção em crianças com alto risco (Adams et al. 1992; Adams et al. 1997; Adams et al. 1998b; Enniful-Eghan et al. 2010). Sabe-se que em crianças sem tratamento e com o DTC de alto risco, o risco de AVC é de 10% por ano (Adams et al. 1998b); além disso, pacientes com AF que já tiveram AVC, o risco de recorrência do evento é estimado de 47% a 93% (Powars et al. 1978; Sarnaik et al. 1979; Moohr et al. 1982; Balkaran et al. 1992).

Em ambos os casos, a redução da concentração da HbS durante as transfusões para 30% ou menos, do total da concentração de Hb, reduz em 70% o risco do AVC (Mack and Thompson 2016). Indispensável à pacientes com complicações cerebrovasculares, o regime hipertransfusional reduz a 10% a chance de um novo AVC, e em pacientes com DTC de alto risco o risco de AVC é 91% menor que em pacientes que não recebem o tratamento (Pegelow et al. 1995; Adams et al. 1998b).

Os mecanismos pelos quais a transfusão regular previne o AVC não são bem conhecidos, porém a redução da HbS ou o aumento da concentração total de Hb, ou ambos, podem trazer efeitos benéficos para os pacientes uma vez que antagoniza os efeitos hemolíticos da doença (Bunn 1997; Adams et al. 1998b). Além disso, a hiperemia nos vasos intracranianos, relacionada ao grau de anemia do paciente, é reduzida pela transfusão e é possivelmente um dos mecanismos de redução do risco de AVC (Venketasubramanian et al. 1994).

Uma vez que a transfusão não pode ser descontinuada nesses pacientes, os riscos a longo prazo relacionados à transfusão, como sobrecarga de ferro e aloimunização, são possíveis de manejar, uma vez que a gravidade e sequelas causadas pelo AVC não podem ser previstas (Adams et al. 1998b; Adams et al. 2005; Saidi et al. 2016; DeBaun and Kirkham 2016).

2.4.2 Hidroxiuréia

A hidroxiuréia (HU), ou hidroxycarbamida, é um agente citostático leve utilizada em doenças onco-hematológicas, e seu uso foi aprovado no Brasil como tratamento da AF há 14 anos (Elford 1968; Brasil, 2002).

Em pacientes com DTC condicionante e seguindo protocolo interno do HEMOPE, a HU é administrada em dose inicial (15mg/Kg/dia) até a dose máxima tolerada (5mg/Kg/dia) de acordo com a resposta de paciente ao medicamento e seguindo os critérios de conduta por toxicidade propostos pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2012).

A administração da HU em pacientes com anemia falciforme possui múltiplos benefícios, que incluem: indução da síntese de HbF, com concomitante aumento na concentração de Hb total e redução da taxa de hemólise (Wyszynski

et al. 2004; Kato et al. 2007). A HU também reduz os números de leucócitos circulantes e a expressão de moléculas de adesão, que contribuem para a vaso-oclusão com efeito aditivo no aumento da biodisponibilidade do NO (Benkerrou et al. 2002). De modo geral, a HU reduz a frequência de crises vaso-oclusivas, a necessidade transfusional e as hospitalizações dos pacientes, além de diminuir a taxa de mortalidade em aproximadamente 40%, quando utilizada por pelo menos um ano (Lanzkron et al. 2008; Strouse et al. 2008; Steinberg et al. 2010).

Apesar de conter alguns efeitos adversos temporários, como leucopenia e plaquetopenia, que poderiam predispor os pacientes a infecções e sangramentos, o risco do uso da HU em pacientes falciformes é aceitável quando comparado com o risco de pacientes falciformes não tratados (Brawley et al. 2008). Ware e cols. (Ware et al. 2012) desenvolveram um estudo (do inglês, *Stroke With Transfusions Changing to Hydroxyurea*, SWITCH) em que a HU foi substituída pelo regime de hipertransusão em pacientes com AF e com AVC prévio e que já tinham passado por, no mínimo, 18 meses de tratamento.

Apesar de inconclusiva a eficácia do uso da HU na prevenção de um novo AVC, devido ao término precoce do estudo, os dados mostraram que 10% dos pacientes tiveram recorrência de AVC (6 casos/100 pacientes/ano) frente a nenhum caso de recorrência nos pacientes com tratamento padrão (transusão) (Ware et al. 2012). Comparativamente, essa taxa é maior que um estudo retrospectivo com crianças que receberam transusão de forma contínua (2.2 por 100 pacientes/ ano), porém menor que 70% de recorrência em pacientes que descontinuaram a transusão e não receberam nenhum tipo de tratamento secundário (Wilimas et al. 1980; Scothorn et al. 2002).

2.5 PANORAMA GENÔMICO E PERSPECTIVAS MOLECULARES PARA PREVENÇÃO DO AVC EM PACIENTES COM AF

Existem evidências suficientes na literatura para apoiar a ideia de que variantes genéticas específicas podem contribuir para o desenvolvimento de doença cerebrovascular na AF (Hoppe et al. 2004; Hoppe et al. 2007; Flanagan et al. 2011; Flanagan et al. 2013; Belisario et al. 2015a; Belisario et al. 2015b).

De fato, estudo realizado em irmãos com AF demonstrou que, quando um deles apresenta altas velocidades do fluxo sanguíneo cerebral avaliada pelo DTC, a probabilidade de o segundo irmão apresentar o mesmo quadro é maior, demonstrando que há um componente genético envolvido no aumento da velocidade do fluxo sanguíneo, e conseqüentemente, desenvolvimento de AVC (Kwiatkowski et al. 2003)

Estes achados, juntamente com as limitações técnicas do DTC, ressaltam a importância de estudos mais aprofundados sobre a potencial associação de variantes genéticas específicas e o desenvolvimento do AVC, fato que poderia ajudar a definir mutações relacionadas à prevenção ou desenvolvimento do desfecho em pacientes com AF (Sheehan et al. 2013; Hyacinth et al. 2015; Reeves et al. 2016; Leonardo et al. 2016).

2.6 ANEXINA A2

A anexina A2 (ANXA2), proteína de 36 kDa membro da superfamília de proteínas ligantes de fosfolipídios dependentes de cálcio, é codificada pelo gene *ANXA2* localizado no braço longo do cromossomo 15 (15q22.2) (Moss and Morgan 2004). Expressa em células endoteliais, monócitos e macrófagos, é uma proteína multifuncional envolvida na sinalização da tradução, proliferação celular e na interação membrana-citoesqueleto além de importante papel na geração de plasmina na superfície extracelular (Hajjar et al. 1994; Kaczan-Bourgeois et al. 1996; Moss and Morgan 2004; Rescher 2004; Gerke et al. 2005; Singh 2007; Flood and Hajjar 2011).

Localizada inicialmente no citoplasma, para que exerça seu papel na fibrinólise, é fosforilada na tirosina da posição 24, no qual contribui com a formação de um complexo com a proteína S10010A (também conhecida como p11), sendo então o complexo translocado para o exterior da membrana celular, onde se instala e atua na via fibrinolítica (Derbyshire et al. 2005; Flood and Hajjar 2011).

Além do importante papel da ANXA2 como ancoradoura da S10010A na superfície celular, ela também atua protegendo a S10010A do processo de

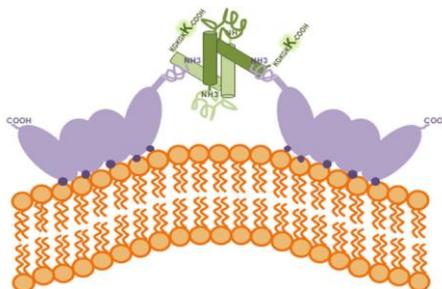
ubiquitinização que poderia acometer a mesma quando ela estivesse exposta na face externa da bicamada lipídica (He et al. 2008).

2.6.1 Papel da anexina A2 na fibrinólise

Após agressões ao endotélio vascular, decorrente da falcização das hemácias, as células endoteliais expressam o fator tecidual e iniciam a cascata de coagulação que resulta na ativação da trombina e posterior deposição de coágulos de fibrina (Solovey et al. 1998; Madureira et al. 2011). Ao mesmo tempo, as vias anticoagulantes e fibrinolíticas são ativadas para evitar a disseminação da coagulação e também para limitar o acúmulo de fibrina (Tanaka et al. 2009; Ait-Oufella et al. 2010). As células endoteliais também promovem a dissolução do coágulo (fibrinólise), onde o zimógeno plasminogênio é ativado em plasmina pelo ativador do plasminogênio tipo-tecidual (tPA) e pelo ativador do plasminogênio tipo-uroquinase (uPA) (Madureira et al. 2011).

A ANXA2 faz parte do complexo anexina A2 heterotretâmero (Allt), um importante receptor do plasminogênio na superfície das células endoteliais (Madureira et al. 2011). O Allt é composto por duas moléculas de ANXA2, que ficam em contato com a membrana da célula, unidas por um dímero da proteína S100A10 pela região N-terminal (Waisman 1995; Lambert et al. 1997; Gerke and Moss 2002). A S100A10 possui um resíduo de lisina no região C-terminal, na qual forma um sítio de ligação para o tPA e plasminogênio, favorecendo o início da cascata fibrinolítica (Figura 4) (Kassam et al. 1998; MacLeod et al. 2003).

Figura 4 - Representação esquemática do complexo Allt na superfície de células endoteliais. É composto por duas moléculas de ANXA2 (em roxo) e duas moléculas da S100A10 (em verde). A letra K, demonstra o sítio de ligação para o plasminogênio e o tPA



Fonte: Madureira et al. (2013) - (Adaptada).

A enzima uPA, não se liga ao complexo Allt, pois esta possui receptor (uPAR) também localizado na membrana das células endoteliais (Choi et al. 2003; Zhang et al. 2004). O uPA é ativado de sua forma pro-uPA pela plasmina, e atua juntamente com o tPA na ativação do plasminogênio, sendo esta uma reação duplo recíproca e cíclica (Stephens et al. 1989).

A cascata fibrinolítica inicia após o processo de proteólise do plasminogênio em plasmina, que atua rompendo as ligações cruzadas entre as moléculas de fibrinas, desfazendo o coágulo formado e gerando os produtos de degradação de fibrina (PDFs) e D-dímeros (Hajjar 2003; Ling et al. 2004).

Estudos tem mostrado que ratos nocaute para o gene *ANXA2* (*ANXA2^{-/-}*), apresentam acúmulo de fibrina no interior dos vasos (Ling et al. 2004). Porém, é importante destacar que *ANXA2* atua no transporte, acomodação e estabilização da S10010A, que é a subunidade de fato, responsável pela ligação e ativação do plasminogênio. (Madureira et al. 2011; Bharadwaj et al. 2013). Deste modo, é bem estabelecido que baixas concentrações de *ANXA2* resultam na depleção da S100A10 na superfície celular, culminando em interrupção da via fibrinolítica (Surette et al. 2011).

Assim, estudos demonstraram que camundongos nocaute para o gene *S100A10* também acumulavam fibrina, não sendo, contudo, resultado de hipercoagulação, uma vez que os testes de coagulação eram semelhantes aos camundongos selvagens (Surette et al. 2011).

Dessa forma, a *ANXA2* responsável por regular a homeostase fibrinolítica inclusive na macrocirculação, possibilita a teoria de comprometimento dessa via, visto que, pacientes com AF e com alteração cerebrovascular (DTC alterado e AVC) possuem frequentemente estenose nas grandes artérias intracranianas (Ling et al. 2004; Helton et al. 2014).

2.6.2 Polimorfismo IVS-14-1046 no gene *ANXA2*

Previamente estudado e relacionado com o desenvolvimento do AVC por Sebastiani e cols. (Sebastiani et al. 2005), o polimorfismo IVS-14-1046 (rs7163836) (do inglês, *intronic variation sequence*) localizado no íntron 14 e na

posição 1046, é o Tag-SNP (Stram 2004) com maior cobertura de SNPs (19 SNPs (Tabela Suplementar I) e com MAF (do inglês, *minimum allele frequency*) maior que 10%, sendo o escolhido para o presente estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a relação do polimorfismo IVS-14-1046 C>T (rs7163836) no gene *ANXA2* com o desenvolvimento do acidente vascular cerebral isquêmico em pacientes com anemia falciforme.

3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a frequência alélica e genotípica do SNP IVS-14-1046 C>T (rs7163836) do gene *ANXA2*;
- b) Investigar a associação do polimorfismo IVS-14-1046 C>T (rs7163836) com o desenvolvimento do acidente vascular cerebral isquêmico;
- c) Determinar os níveis de expressão do gene *ANXA2* em pacientes pediátricos com anemia falciforme e associar esses achados com o polimorfismo IVS-14-1046 C>T (rs7163836).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

O estudo foi do tipo corte transversal retrospectivo analítico realizado no período de maio/2015 a dezembro/2016. Após a análise de 257 prontuários de pacientes pediátricos portadores de AF de Pernambuco, foram incluídos, de acordo com os resultados do DTC, 196 pacientes sem parentesco entre si, acompanhados no ambulatório de Triagem Neonatal do Hospital de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco - HEMOPE. Os pacientes foram alocados nos seguintes grupos:

- Normal: Pacientes com média da velocidade máxima de fluxo sanguíneo < 170 cm/s;
- Condicionante: Pacientes com média da velocidade máxima de fluxo sanguíneo entre 170 – 199 cm/s;
- Alto Risco: Pacientes com média da velocidade máxima de fluxo sanguíneo \geq 200 cm/s.

Os prontuários dos pacientes inseridos no estudo foram avaliados para documentação dos dados clínicos e laboratoriais. Todos os pacientes realizaram ressonância magnética nuclear e/ou tomografia computadorizada, tanto para confirmar a hipótese diagnóstica do AVC quanto para descartar lesões neurológicas secundárias nos que não desenvolveram a manifestação.

A cada convocação por telefone ou durante as visitas de rotina, cerca de 5 mL de sangue periférico foram coletados em tubos a vácuo contendo EDTA como anticoagulante e conduzido para o laboratório de Hemoglobinopatias da Unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE-HEMOPE) e Setor de Hematologia do Laboratório Central (LabCen) do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco para a realização de testes moleculares.

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde/UFPE (Nº do parecer: 413.574) (Anexo I). Após a aprovação, foi desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). A

Fundação HEMOPE, foi incluída como co-instituição pela obtenção das amostras e informação através de prontuários acerca dos pacientes.

Todos os pacientes envolvidos, ou os seus responsáveis, foram orientados sobre a proposta do projeto e assinaram, quando em concordância, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices A e B) previamente aprovado pelo CEP.

4.2 CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS

Baseado nas ideias de Lettre e cols. (Lettre et al. 2008) acerca da exclusão do estudo de pacientes menores de cinco anos devido aos níveis de HbF ainda não estarem estáveis nessa idade, índices hematológicos (contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina, corpuscular média, HbF, plaquetas e reticulócitos) e índices bioquímicos (lactato desidrogenase, bilirrubina direta, bilirrubina indireta e bilirrubina total), usualmente utilizados em trabalhos com pacientes com AF, não foram incluídos nas análises estatísticas deste trabalho. Apenas a Hb basal (Hb média de cada paciente) foi levada em consideração.

Além disso, para tais exames acima dos cinco anos é necessário que os pacientes não estejam em uso de HU, fato este não usual nos pacientes pediátricos com AF do HEMOPE.

4.3 ANÁLISE MOLECULAR

4.3.1 Extração do DNA Genômico para Genotipagem

Para a análise do polimorfismo foi realizada a extração de DNA genômico a partir de leucócitos, obtidos de amostras de sangue periférico, pela técnica de fenol-clorofórmio modificado (Davis et al., 1986).

4.3.2 Genotipagem do Polimorfismo IVS-14-1046

O Tag-SNP IVS-14-1046 C>T (rs7163836) (MAF global: 0,47) foi selecionado através do Ensembl (ensembl.org) que se baseia no banco de dados

do 1000 Genomes e utilizou-se a população YRI e CEU para definir os polimorfismos em desequilíbrio de ligação (Suplementar I).

A detecção do polimorfismo foi realizada por PCR em tempo real (qPCR) por discriminação alélica utilizando o sistema TaqMan®, que consiste de sondas marcadas com fluorocromos desenhadas especificamente para serem complementares à cadeia de oligonucleotídeos. As sondas utilizadas no estudo foram VIC (yellow) e FAM (green) e o primer utilizado para pesquisa do polimorfismo está disponível para o uso em pesquisa de caráter científico no site <https://products.appliedbiosystems.com> – ID: C_9036149_10. Para realização desta técnica foi utilizado o aparelho Rotor Gene 6000TM (Corbett Research, Austrália). As condições da reação encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 - Protocolo padrão de condição de reação da TaqMan® para amplificação por qPCR.

	Hold	40 Ciclos	
		Desnaturação	Hibridização/ Extensão
Tempo	10 minutos	15 segundos	1 minuto
Temperatura	95 °C	92 °C	60 °C

Fonte: Medeiros (2017)

4.3.3 Extração de mRNA para expressão gênica

Para a análise de expressão gênica da *ANXA2*, amostras de 4 mL de sangue periférico de pacientes com AF foram coletados e utilizados para o isolamento do mRNA dos leucócitos através do reagente TRIzol®, seguindo as instruções do fabricante.

A análise de integridade das amostras foi realizada em gel de eletroforese a 1% e foram quantificadas por espectrofotometria (NanoDrop® 2000, Thermo Fisher Scientific, USA) com razão de absorbância 260/280 próximo de 2,0. Nenhuma amostra de RNA mostrou-se degradada ou parcialmente degradada.

4.3.4 Síntese de cDNA e expressão gênica da *ANXA2*

Para a síntese de DNA complementar (cDNA) foi utilizado o kit de transcrição reversa High-Capacity (Applied Biosystems, USA), seguindo as recomendações do fabricante, onde 1 µg de RNA total foram utilizados a cada 10 µL de reação.

Sondas de hidrólise (TaqMan®) para o gene *ANXA2* (Hs00743063_s1) e gene de referência (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, *GAPDH*) (Hs0278664_g1) foram utilizadas. Realizadas em duplicatas técnicas, as reações foram executadas em placas de 96 poços da SSI (Scientific Specialties Incorporated, USA) livres de DNase, DNA e inibidores de PCR, seladas com adesivos da mesma marca.

O ensaio de expressão gênica foi realizado por qPCR quantitativo no equipamento AriaMx (Agilent Technologies, USA) com condições de reação demonstradas na tabela 2.

Tabela 2 - Protocolo padrão de condição de reação de sondas de hidrólise (TaqMan®) para a reação de expressão gênica.

	UDG (DNA)	Hot Start	Amplificação	
	1 Ciclo	1 Ciclo	40 Ciclos	
Tempo	2 minutos	10 minutos	15 segundos	1 minuto
Temperatura	50 °C	95 °C	95 °C	60° C

Fonte: Medeiros (2017)

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características clínicas e característica laboratorial dos pacientes foram mostradas descritivamente. O teste Chi-quadrado ou exato de Fisher (quando aplicável) foi utilizado para comparações entre variáveis categóricas e o Kruskal-Wallis foi utilizada para comparações entre as variáveis contínuas. O risco para o desenvolvimento da manifestação (AVC) foi avaliado a partir da análise das datas de desenvolvimento desta complicação, em relação a data de admissão ao serviço de referência. Curvas de incidência (1- Kaplan-Meier) foram construídas refletindo o tempo para o desenvolvimento das complicações com o teste de log-rank utilizado para a comparação das curvas (Kim 2007). Os resultados da

expressão gênica foram calculados por meio do método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Cq}$, como descrito por Pfaffl (Pfaffl 2001). 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 e Stata Statistic/Data Analysis versão 12 (Stata Corporation, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO DA COORTE

Com um segmento médio de 12,5 anos (Intervalo de confiança (IC) 95%: 12,2 a 12,8 anos), a taxa de desenvolvimento de AVC no grupo pediátrico com AF foi 4,1% (8 pacientes) com mediana de 7 anos (1,5 – 9,2). De acordo os resultados da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral avaliado pelo DTC e seguindo os critérios de classificação de risco para o desenvolvimento de AVC preconizados pelo estudo STOP (Adams et al., 1998a), 137 (70%) pacientes foram classificados como DTC normal, 39 (20%) como DTC condicionante e 20 (10%) como DTC de alto risco. A taxa de desenvolvimento de AVC nos referidos grupos foi de 3% para pacientes com DTC normal, 2,5% para pacientes com DTC na faixa condicionante e 15% para pacientes com DTC de alto risco. Dentre os oito pacientes que desenvolveram AVC houve apenas uma recorrência do evento (12,5%).

Pacientes analisados que nunca realizaram o exame de DTC (50 pacientes; 19,5%), que apresentaram DTC inadequado (isto é, velocidade de fluxo não detectada pelo exame devido à limitação técnica, 6 pacientes; 2,3%) ou inconclusivo (isto é, resultados de DTC que não puderam ser interpretados, 5 pacientes; 1,9%) foram excluídos da análise.

5.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO IVS-14-1046 C>T (RS7163836)

A pesquisa do polimorfismo IVS-14-1046 C>T foi possível ser realizada em amostras de DNA genômico de 182 pacientes (93%); os 7% pacientes não incluídos não foi possível obter as amostras de sangue para a extração de DNA. As populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na população estudada a frequência alélica estimada do alelo C foi de 0,541 e do alelo T é de 0,459. Com relação a genotipagem, 50 pacientes (28%) apresentaram genótipo selvagem (CC), 97 pacientes (53%) apresentaram genótipo heterozigoto (CT) e 35 pacientes (19%) apresentaram genótipo homozigoto variante (TT).

Para as análises de associação, foram aplicados os modelos de herança genética recessivo, dominante e codominante para ambos os polimorfismos. Contudo, como o modelo dominante para o polimorfismo IVS-14-1046 C>T foi o que melhor representou nossos resultados, este modelo foi aplicado nas análises de associação subsequentes.

5.3 ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO IVS-14-1046 C>T E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM AF

A Tabela 3 resume as principais características clínicas dos pacientes pediátricos com AF de acordo com o polimorfismo IVS-14-1046 C>T no gene *ANXA2*. Nenhuma diferença significativa foi observada entre o polimorfismo estudado com o aumento da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral nos pacientes com AF alocados nos grupos DTC normal, condicionante e alto risco analisados ($P=0,308$) (Tabela 4). Contudo, quando analisados separadamente, pacientes alocados no grupo DTC normal com o genótipo homozigoto variante (TT) apresentaram uma maior frequência de AVC (14%; $P = 0,006$).

Tabela 3. Características clínicas de pacientes pediátricos com AF de acordo com o polimorfismo IVS-14-1046 C>T no gene ANXA2.

Variáveis	Todos pacientes (n = 196)		Polimorfismo IVS-14-1046 C>T no gene ANXA2 (n = 182)						P-valor ¹
			CC (n = 50)		CT (n = 97)		TT (n = 35)		
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
Sexo									0,473
Feminino	99	50,5	22	44	53	55	18	51	
Masculino	97	49,5	28	56	44	45	17	49	
Haplótipo									0,994
CAR/CAR	104	60	30	60	53	60	20	59	
não-CAR/CAR	70	40	20	40	36	40	14	41	
Não determinado	22	-	-	-	8	-	1	-	
Deleção α ^{-3.7}									0,321
Normal	80	80	19	73	47	85,5	14	74	
Mutado	20	20	7	27	8	14,5	5	26	
Não determinado	96	-	24	-	42	-	16	-	

1: Valores não determinados foram excluídos dos cálculos estatísticos. Fonte: Medeiros (2017)

Tabela 4. Frequência observada do SNP, de acordo com o modelo codominante, em pacientes pediátricos com AF e de acordo com o resultado do DTC.

		Classificação			P-valor ¹
		Normal n (%)	Condicionante, n (%)	Alto Risco, n (%)	
IVS-14-1046	CC	35 (28,5%)	9 (23%)	6 (30%)	0,308
C→T	CT	67 (54,5%)	23 (59%)	7 (35%)	
	TT	21 (17%)	7 (18%)	7 (35%)	
	Não determinado	14	-	-	
	Total	137	39	20	182

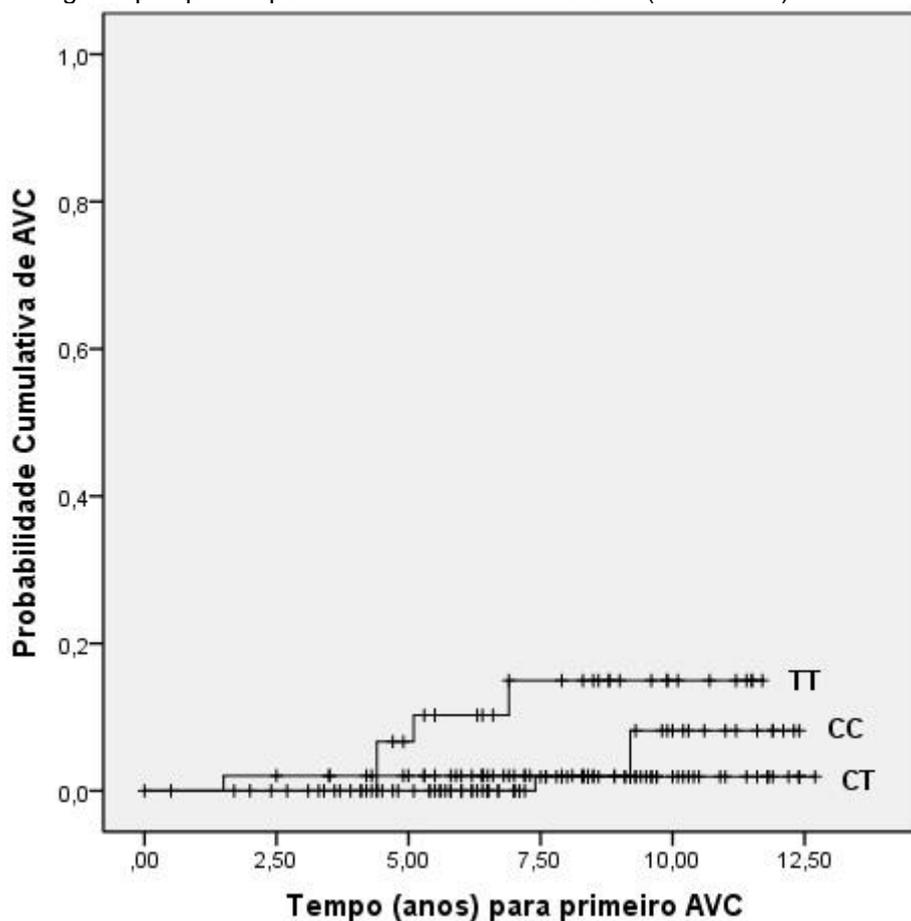
1: Valores não determinados foram excluídos dos cálculos estatísticos. Fonte: Medeiros (2017)

Não houve associação entre a frequência alélica e o desenvolvimento de AVC ($P=0,0604$), entretanto, pacientes com alelo T apresentaram maior frequência de AVC (3%) quando comparado com pacientes com alelo C (1,4%).

5.4 DESFECHO CLÍNICO DOS PACIENTES COM AF DE ACORDO COM O POLIMORFISMO IVS-14-1046 C>T NO GENE ANXA2

Pacientes com o genótipo homozigoto variante (TT) para o polimorfismo IVS-14-1046 C>T apresentaram um segmento mediano de 7 anos (variação: 1 – 13), enquanto que os pacientes com genótipo heterozigoto (CT) apresentaram um segmento mediano 8 anos (variação: 1 – 13) e genótipo selvagem (CC) 7 anos (variação: 3 – 12). A taxa estimada para o desenvolvimento de AVC em 10 anos de todos os pacientes foi de 6% (IC 95%: 2,7 a 13,7%). Pacientes com o genótipo homozigoto variante (TT) para o polimorfismo IVS-14-1046 C>T apresentaram uma maior taxa estimada de AVC em 10 anos (15,4%, IC95%: 5,6 a 42%) quando comparados com pacientes com genótipo heterozigoto (2%, IC95%: 0,2 a 13%) e selvagem (8%, IC95%: 1,7 a 39,2%) ($P = 0,02$; Figura 5).

Figura 5 - Probabilidade cumulativa para desenvolvimento de AVC em pacientes com AF de acordo com os genótipos para o polimorfismo IVS-14-1046 C>T (rs7163836).



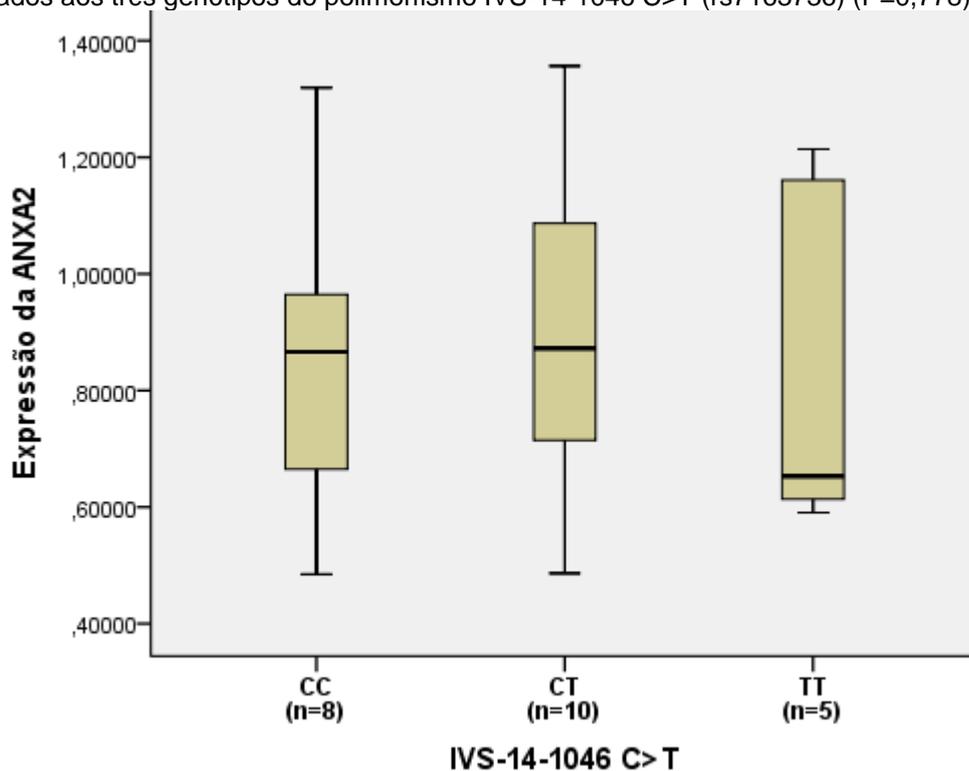
Fonte: Medeiros (2017)

De acordo com a análise de risco proporcional de Cox, a presença do genótipo homozigoto variante (TT) para o polimorfismo IVS-14-1046 C>T foi associado com menor tempo de desenvolvimento de AVC (*hazard ratio* (HR): 5,87; IC95%: 1,31 – 26,3; $P = 0,02$).

5.5 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA COM O POLIMORFISMO IVS-14-1046 C>T (RS7163836)

A análise de expressão gênica da *ANXA2* foi realizada em 23 pacientes, sendo 8 com genótipo homozigoto selvagem (CC), 10 heterozigotos (CT) e 5 homozigotos variantes (TT) para o polimorfismo IVS-14-1046 C>T. Não houve diferença do perfil de expressão da *ANXA2* entre os grupos (Figura 6) ($P=0,778$).

Figura 6 - Análise da expressão gênica do gene *ANXA2* em pacientes pediátricos com AF comparados aos três genótipos do polimorfismo IVS-14-1046 C>T (rs7163736) (P=0,778).



Fonte: Medeiros (2017)

5.6 ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO COM FATORES DE RISCO PARA DESENVOLVIMENTO DO AVC

Cinco variáveis previamente relacionados ao desenvolvimento de AVC isquêmico por Ohene-Frempong e cols. (Ohene-Frempong et al. 1998) e até atualmente utilizadas, foram, nesse estudo, associadas com o polimorfismo IVS-14-1046 C>T, entretanto, não houve diferença entre os grupos, como resume a tabela 5.

Tabela 5 - Variáveis relacionadas ao desenvolvimento de AVC em pacientes pediátricos com AF de acordo com o polimorfismo IVS-14-1046 no gene *ANXA2*.

	Polimorfismo IVS- 14-1046 C>T no gene <i>ANXA2</i> (n=182)			P-valor ¹
	(CC) (n=50)	(CT) (n=97)	(TT) (n=35)	
	n. (%)	n. (%)	n. (%)	
Infarto silencioso				0,525
Sim	2 (4%)	3 (31%)	-	
Não	48 (96%)	94 (69%)	35 (100%)	
Ataque isquêmico transitório				0,647
Sim	0	1 (1%)	0	
Não	50 (100%)	96 (99%)	35 (100%)	
Hipertensão arterial sistêmica				0,644
Sim	0	1 (1%)	0	
Não	50 (100%)	96 (99%)	35 (100%)	
STA				0,591
Sim	6 (12%)	11 (11%)	2 (6%)	
Não	44 (88%)	86 (89%)	33 (94%)	
Hemoglobina basal (g/dL), mediana	8	7,9	7,7	0,342
Intervalo	5,5 – 10,7	6,0 – 9,9	5,3 – 9,6	

Fonte: Medeiros (2017)

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, nós mostramos que o polimorfismo IVS-14-1046 C>T (rs7163836), um Tag-SNP, no gene *ANXA2* esteve associado com uma maior frequência de desenvolvimento de AVC isquêmico em pacientes pediátricos com AF. Precisamente, crianças com genótipo variante (TT) apresentaram uma taxa estimada de AVC em 10 anos de 15,4%, comparado a 2% em heterozigotos (CT) e 8% em selvagem (CC), possuindo risco de quase 6 vezes maior de desenvolver AVC. Por último, os níveis de expressão da *ANXA2* estudados não foram associados com o polimorfismo citado. Associações diretas entre SNPs e complicações da AF (AVC, úlceras de perna, osteonecrose, priapismo, hipertensão pulmonar) vem sendo ostensivamente estudadas por vários grupos de pesquisa (Baldwin et al. 2005; Nolan et al. 2005; Nolan et al. 2006; Flanagan et al. 2011; Bean et al. 2013; Flanagan et al. 2013; Rodrigues et al. 2016; Upadhye et al. 2016a). Entretanto, poucos estudos são direcionados a pacientes pediátricos no sentido de explorar a influência de alterações genéticas, nesse caso, sob o AVC, utilizando-se como critério de estratificação a ferramenta de identificação de risco exclusiva de crianças para essa manifestação – o DTC (Adams 2014; Upadhye et al. 2016b; Belisário et al. 2016a; Belisário et al. 2016b).

Crianças diagnosticadas pelo teste do pezinho – Programa Nacional de Triagem Neonatal possuem assistência especializada desde o nascimento e admissão no serviço de referência, com intuito de tratamento precoce específico e redução das sequelas associadas à doença (Brasil, 2002). Essa metodologia parece ser a mais adequada para estudos com o AVC, pois consegue-se acompanhar de perto a evolução clínica dos pacientes, trazendo maior homogeneidade e precisão aos dados., além de excluir comorbidades adquiridas ao longo dos anos por pacientes adultos.

Nas crianças com AF e anteriormente à medida profilática implantada por Lusher e cols. 1979, o AVC era uma das complicações de maior morbimortalidade, chegando a acometer cerca de 10% desses pacientes (Lusher et al. 1976). Dada a eficácia da transfusão inicialmente utilizada na prevenção à recorrência do AVC, o DTC foi adaptado para que crianças com AF fossem identificadas com alto risco de desenvolvimento de AVC (VMMF \geq 200 cm/s), iniciando-se então a terapia transfusional como prevenção primária (Mack and

Thompson 2016). Apesar de satisfatória, a transfusão periódica e ininterrupta não reduz completamente novos casos nem a reincidência do AVC (Scothorn et al. 2002) Além disso, a limitação técnica do DTC, as possíveis complicações relacionadas à transfusão e até mesmo a relutância de alguns pacientes/famílias no comprometimento em um programa transfusional a longo prazo, limitam o estudo (Reeves et al. 2016; Chou and Fasano 2016). Dessa forma, esses obstáculos levam à busca de genes moduladores que possam influenciar no desenvolvimento do AVC e, posteriormente, à procura de novos métodos de prevenção dessa manifestação (Hyacinth et al. 2015; DeBaun and Kirkham 2016).

Considerando a função já esclarecida da ANXA2 na via fibrinolítica, estudos com camundongos nocaute para o gene *ANXA2* (*ANXA2^{-/-}*) demonstraram que a deficiência da proteína promove acúmulo de fibrina nos vasos (Ling et al. 2004). Nesse estudo, os modelos murinos (*ANXA2^{-/-}*) foram submetidos a estresse oxidativo induzidos pelo cloreto de ferro (FeCl_3), fazendo com que a cascata de coagulação dos camundongos fosse iniciada. Entretanto, com a via fibrinolítica prejudicada, esses camundongos eram incapazes de desfazer o coágulo, acumulando fibrina e diminuindo, conseqüentemente o fluxo sanguíneo no vaso. De forma análoga à pacientes com AF onde a lesão constante é promovida em decorrência da hemólise e hemácias falcizadas (Steinberg 2008), o estudo supracitado nos sugere fortemente que o fenótipo hipofibrinolítico e o acúmulo de fibrina intravascular possa, em última análise, aumentar o risco de desenvolvimento de AVC nos pacientes com AF.

Nesse contexto, estudos como o STOP I deixam evidente que o risco de AVC é inversamente proporcional ao diâmetro do vaso (Adams 2014), porém, nossos dados demonstram que o risco não é exclusivamente associado às velocidades, visto que 3% pacientes com DTC normal desenvolveram esta manifestação e 14% destes com velocidade normal possuíam o genótipo variante para o polimorfismo IVS-14-1046 C>T, destacando que o risco do AVC não é completamente compreendido. Além disso, a presença do genótipo TT foi associado a um risco 5,8 vezes maior de desenvolvimento do AVC.

Em uma investigação quanto a possível influência e localização dos polimorfismos marcados por esse Tag-SNP, apenas o polimorfismo rs7165285 C>T (loc: crom15: 60327093) está em uma região anotada como regulatória, posicionado em uma região de ligação do fator de transcrição CTCF (do inglês

CCCTC-binding factor) (loc.: crom15: 60326842-60327161); enquanto os outros SNPs estão em região intrônica não anotada como regulatórias (Aken et al. 2016). De acordo com o catálogo de elementos regulatórios do ORegAnno (do inglês, *Open Regulatory Annotation*), o gene *ANXA2* é um dos genes regulados por esta região (ID do ORegAnno: OREG1378475).

Estudos voltados ao entendimento das funções regulatórias genéricas do CTCF demonstram que esse pode estar envolvido na regulação gênica incluindo repressão/ativação do promotor, insulador e formação de alças (loops) na cromatina (Splinter et al. 2006; Phillips and Corces 2009). Contudo, nosso estudo, demonstrou que o polimorfismo IVS-14-1046 C>T na *ANXA2* e o desequilíbrio de ligação com o rs7165285 não influencia no comprometimento de alguma forma na ligação do CTCF à região específica do DNA com consequente implicação na expressão da *ANXA2*. Apesar da limitação do número de amostras, nossos dados deixam claro que o gene *ANXA2* parece estar comprometido de alguma forma, ainda não esclarecida, e influenciando a complicação clínica na população estudada. Por outro lado, o rs7165285 foi determinado em desequilíbrio com o IVS-14-1046 tendo como base a população CEU, no entanto, a população de Pernambuco, Brasil, reflete uma população miscigenada com contribuição de índios, europeus e africanos, não representada nas análises de desequilíbrio de ligação, o que pode afetar no refinamento dos padrões haplotípicos (Manta et al., 2013; Zaitlen et al., 2017).

Sebastiani e cols. (Sebastiani et al. 2005) utilizando uma rede de interação Bayesiana, onde 1398 pacientes afro-americanos com AF foram analisados para 108 SNPs em 39 genes candidatos, foi o único trabalho que avaliou a influência do polimorfismo IVS-14-1046 C>T no AVC. Demonstrando, assim, que apesar do esforço crescente para identificação de marcadores moleculares de risco de AVC, nenhum está bem estabelecidos ou tem influência suficiente na prática clínica (Belisário et al. 2012).

Em síntese, a ausência de estudos em pacientes com AF no gene *ANXA2* explorando o papel de possíveis mecanismos de oclusão de vasos associados à complicação cerebrovascular, demonstra que trabalhos complementares são importantes para definir o seu papel biológico na relação com o AVC. Desta forma, a incorporação de marcadores moleculares à estratificação precoce de risco para o desenvolvimento de AVC, juntamente ao DTC, deve beneficiar

principalmente pacientes com DTC normal, haja vista que o risco de AVC nesses pacientes existe, porém, não é possível de ser identificada pelo método usual de prevenção.

7 CONCLUSÕES

- O polimorfismo IVS-14-1046 C>T (rs7163836) no gene *ANXA2* mostrou-se associado com desenvolvimento do AVC isquêmico em pacientes pediátricos com AF;
- O genótipo TT para o polimorfismo IVS-14-1046 C>T (rs7163836), apresentou uma maior taxa estimada de AVC em 10 anos quando comparados com os genótipos CC e CT;
- O polimorfismo IVS-14-1046 C>T (rs7163836) não demonstrou associação o DTC;
- O polimorfismo IVS-14-1046 C>T (rs7163836) não influencia na expressão do gene *ANXA2*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASLID R, Markwalder T-M and Nornes H (1982) Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries. *J Neurosurg* 57:769–774. doi: 10.3171/jns.1982.57.6.0769

ADAMS RJ (2004) Stroke and conversion to high risk in children screened with transcranial Doppler ultrasound during the STOP study. *Blood* 103:3689–3694. doi: 10.1182/blood-2003-08-2733

ADAMS RJ (2014) Prevention of Stroke in Sickle Cell Anemia. *J Law, Med Ethics* 42:135–138. doi: 10.1111/jlme.12128

ADAMS RJ, Brambilla D and Optimizing Primary Stroke Prevention in Sickle Cell Anemia Trial I (2005) Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med* 353:2769–2778. doi: 10.1056/NEJMoa050460

ADAMS RJ, McKie VC, Brambilla D, Carl E, Gallagher D, Nichols FT, Roach S, Abboud M, Berman B, Driscoll C et al. (1998a) Stroke prevention trial in sickle cell anemia. *Control Clin Trials* 19:110–129.

ADAMS RJ, McKie VC, Carl EM, Nichols FT, Perry R, Brock K, McKie K, Figueroa R, Litaker M, Weiner S et al. (1997) Long-term stroke risk in children with sickle cell disease screened with transcranial Doppler. *Ann Neurol* 42:699–704. doi: 10.1002/ana.410420505

ADAMS RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, Abboud M, Gallagher D, Kutlar A, Nichols FT et al. (1998b) Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med* 339:5–11. doi: 10.1056/NEJM199807023390102

ADAMS RJ, Nichols FT, Figueroa R, McKie V and Lott T (1992) Transcranial Doppler correlation with cerebral angiography in sickle cell disease. *Stroke* 23:1073–1077.

AIT-OUFELLA H, Maury E, Lehoux S, Guidet B and Offenstadt G (2010) The endothelium: Physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med* 36:1286–1298. doi: 10.1007/s00134-010-1893-6

AKEN BL, Ayling S, Barrell D, Clarke L, Curwen V, Fairley S, Fernandez-Banet J, Billis K, Garcia-Giron C, Hourlier T et al. (2016) The Ensembl Gene Annotation System. *Database (Oxford)* 2016:baw093. doi: 10.1093/database/baw093

ALSULTAN A, Solovieff N, Aleem A, AlGahtani FH, Al-Shehri A, Osman ME, Kurban K, Bahakim H, Al-Momen AK, Baldwin CT et al. (2011) Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Saudi patients from the Southwestern province have similar HBB haplotypes but higher HbF levels than African Americans. *Am J Hematol*

86:612–614. doi: 10.1002/ajh.22032

ARCHER N, Galacteros F and Brugnara C (2015) 2015 Clinical trials update in sickle cell anemia. *Am J Hematol* 90:934–950. doi: 10.1002/ajh.24116

BALDWIN C, Nolan VG, Wyszynski DF, Ma QL, Sebastiani P, Embury SH, Bisbee A, Farrell J, Farrer L and Steinberg MH (2005) Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. *Blood* 106:372–375. doi: 10.1182/blood-2005-02-0548

BALKARAN B, Char G, Morris JS, Thomas PW, Serjeant BE and Serjeant GR (1992) Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. *J Pediatr* 120:360–366.

BALLAS SK and Mohandas N (1996) Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am* 10:1221–1239.

BANDEIRA FMGC, Santos MNN, Bezerra MAM, Gomes YM, Araujo AS, Braga MC, Souza WV and Abath FGC (2008) [Family screening for HBB*S gene and detection of new cases of sickle cell trait in Northeastern Brazil]. *Rev Saude Publica* 42:234–241.

BEAN CJ, Boulet SL, Yang G, Payne AB, Ghaji N, Pyle ME, Hooper WC, Bhatnagar P, Keefer J, Barron-Casella EA et al. (2013) Acute chest syndrome is associated with single nucleotide polymorphism-defined beta globin cluster haplotype in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 163:268–276. doi: 10.1111/bjh.12507

BELISÁRIO AR, Martins ML, Velloso-Rodrigues C, Silva CM and Viana MB (2012) Alpha-thalassemia protects against cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Arq Neuropsiquiatr* 70:645.

BELISARIO AR, Nogueira FL, Rodrigues RS, Toledo NE, Cattabriga AL, Velloso-Rodrigues C, Duarte FO, Silva CM and Viana MB (2015a) Association of alpha-thalassemia, TNF-alpha (-308G>A) and VCAM-1 (c.1238G>C) gene polymorphisms with cerebrovascular disease in a newborn cohort of 411 children with sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis* 54:44–50. doi: 10.1016/j.bcmd.2014.08.001

BELISÁRIO AR, Rodrigues Sales R, Evelin Toledo N, Velloso-Rodrigues C, Maria Silva C and Borato Viana M (2016a) Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Brazilian Children With Sickle Cell Anemia is not Associated With Clinical Ischemic Stroke or High-Risk Transcranial Doppler. *Pediatr Blood Cancer* 63:1046–1049. doi: 10.1002/pbc.25924

BELISÁRIO AR, Sales RR, Toledo NE, Muniz MB de SR, Velloso-Rodrigues C, Silva CM and Viana MB (2016b) 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. *Ann Hematol* 95:1869–80. doi: 10.1007/s00277-016-2789-5

BELISARIO AR, Sales RR, Toledo NE, Velloso-Rodrigues C, Silva CM and Viana MB (2015b) Association between ENPP1 K173Q and stroke in a newborn cohort of 395 Brazilian children with sickle cell anemia. *Blood* 126:1259–1260. doi: 10.1182/blood-2015-05-645176

BENKERROU M, Delarche C, Brahimi L, Fay M, Vilmer E, Elion J, Gougerot-Pocidallo MA and Elbim C (2002) Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H₂O₂ production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. *Blood* 99:2297–2303.

BERNAUDIN F, Verlhac S, Chevret S, Torres M, Coic L, Arnaud C, Kamdem A, Hau I, Grazia Neonato M and 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* 112:4314–4317. doi: 10.1182/blood-2008-03-143891

BEZERRA MAC, Santos MNN, Araujo AS, Gomes YM, Abath FGC and 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* 31:83–88. doi: 10.1080/03630260601057153

BHARADWAJ A, Bydoun M, Holloway R and Waisman D (2013) Annexin A2 heterotetramer: Structure and function. *Int J Mol Sci* 14:6259–6305. doi: 10.3390/ijms14036259

BRAWLEY OW, Cornelius LJ, Edwards LR, Gamble VN, Green BL, Inturrisi CE, James AH, Laraque D, Mendez MH, Montoya CJ et al. (2008) NIH consensus development statement on hydroxyurea treatment for sickle cell disease. *NIH Consens State Sci Statements* 25:1–30.

BUNN HF (1997) Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 337:762–769. doi: 10.1056/NEJM199709113371107

CANÇADO RD and Jesus J a (2007) A doença falciforme no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 29:204–206. doi: 10.1590/S1516-84842007000300002

CHOI K-S, Fogg DK, Yoon C-S and Waisman DM (2003) p11 regulates extracellular plasmin production and invasiveness of HT1080 fibrosarcoma cells. *FASEB J* 17:235–46. doi: 10.1096/fj.02-0697com

CHOU ST and Fasano RM (2016) Management of Patients with Sickle Cell Disease Using Transfusion Therapy: Guidelines and Complications. *Hematol Oncol Clin North Am* 30:591–608. doi: 10.1016/j.hoc.2016.01.011

CONNES P, Alexy T, Detterich J, Romana M, Hardy-Dessources MD and Ballas SK (2016) The role of blood rheology in sickle cell disease. *Blood Rev* 30:111–118. doi: 10.1016/j.blre.2015.08.005

CONNES P, Verlhac S and Bernaudin F (2013) Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. *Br J*

Haematol 161:484–498. doi: 10.1111/bjh.12300

DE CEULAER K, Higgs DR, Weatherall DJ, Hayes RJ, Serjeant BE and Serjeant GR (1983) alpha-Thalassemia reduces the hemolytic rate in homozygous sickle-cell disease. *N Engl J Med* 309:189–190. doi: 10.1056/NEJM198307213090320

DEBAUN MR, Armstrong FD, McKinstry RC, Ware RE, Vichinsky E and Kirkham FJ (2012) Silent cerebral infarcts: a review on a prevalent and progressive cause of neurologic injury in sickle cell anemia. *Blood* 119:4587–4596. doi: 10.1182/blood-2011-02-272682

DEBAUN MR and Kirkham FJ (2016) New option for primary stroke prevention in sickle cell anaemia. *Lancet (London, England)* 387:626–627. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01130-7

DERBYSHIRE ZE, Halfter UM, Heimark RL, Sy TH and Vaillancourt RR (2005) Angiotensin II stimulated transcription of cyclooxygenase II is regulated by a novel kinase cascade involving Pyk2, MEKK4 and annexin II. *Mol Cell Biochem* 271:77–90. doi: 10.1007/s11010-005-5386-9

DOMINGOS IF, Falcao DA, Hatzlhofer BL, Cunha AF, Santos MN, Albuquerque DM, Fertrin KY, Costa FF, Azevedo RC, Machado CG et al. (2014) Influence of the betas haplotype and alpha-thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. *Ann Hematol* 93:1123–1129. doi: 10.1007/s00277-014-2016-1

EL-HAZMI MA, Warsy AS, Bashir N, Beshlawi A, Hussain IR, Temtamy S and Qubaili F (1999) Haplotypes of the beta-globin gene as prognostic factors in sickle-cell disease. *East Mediterr Heal J* 5:1154–1158.

ELFORD HL (1968) Effect of hydroxyurea on ribonucleotide reductase. *Biochem Biophys Res Commun* 33:129–135.

ENNINFUL-EGHAN H, Moore RH, Ichord R, Smith-Whitley K and Kwiatkowski JL (2010) Transcranial Doppler ultrasonography and prophylactic transfusion program is effective in preventing overt stroke in children with sickle cell disease. *J Pediatr* 157:479–484. doi: 10.1016/j.jpeds.2010.03.007

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. doi: 10.1182/blood-2011-01-332205

FLANAGAN JM, Sheehan V, Linder H, Howard TA, Wang YD, Hoppe CC, Aygun B, Adams RJ, Neale GA and Ware RE (2013) Genetic mapping and exome sequencing identify 2 mutations associated with stroke protection in pediatric patients with sickle cell anemia. *Blood* 121:3237–3245. doi: 10.1182/blood-2012-10-464156

FLOOD EC and Hajjar KA (2011) The annexin A2 system and vascular

- homeostasis. *Vascul Pharmacol* 54:59–67. doi: 10.1016/j.vph.2011.03.003
- GERKE V, Creutz CE and Moss SE (2005) Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:449–61. doi: 10.1038/nrm1661
- GERKE V and Moss SE (2002) Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82:331–371. doi: 10.1152/physrev.00030.2001
- GIBSON JS and Ellory JC (2002) Membrane transport in sickle cell disease. *Blood Cells Mol Dis* 28:303–314.
- HAIJAR KA, Jacovina AT and Chacko J (1994) An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem* 269:21191–21197.
- HE KL, Deora AB, Xiong H, Ling Q, Weksler BB, Niesvizky R and Hajjar KA (2008) Endothelial cell annexin A2 regulates polyubiquitination and degradation of its binding partner S100A10/p11. *J Biol Chem* 283:19192–19200. doi: 10.1074/jbc.M800100200
- 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* 124:891–898. doi: 10.1182/blood-2013-12-545186
- HEROLD S, Brozovic M, Gibbs J, Lammertsma AA, Leenders KL, Carr D, Fleming JS and Jones T (1986) Measurement of regional cerebral blood flow, blood volume and oxygen metabolism in patients with sickle cell disease using positron emission tomography. *Stroke* 17:692–698.
- HIGGS DR, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Hayes RJ, Grandison Y, Lowrie Y, Mason KP, Serjeant BE et al. (1982) The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. *N Engl J Med* 306:1441–1446. doi: 10.1056/NEJM198206173062402
- HOPPE C (2005) Defining stroke risk in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 128:751–766. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.05310.x
- HOPPE C, Klitz W, Cheng S, Apple R, Steiner L, Robles L, Girard T, Vichinsky E, Styles L and Investigators C (2004) Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood* 103:2391–2396. doi: 10.1182/blood-2003-09-3015
- HOPPE C, Klitz W, D'Harlingue K, Cheng S, Grow M, Steiner L, Noble J, Adams R, Styles L and Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia I (2007) Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Stroke* 38:2241–2246. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.483115
- HURLET-JENSEN AM, Prohovnik I, Pavlakis SG and Piomelli S (1994) Effects of

total hemoglobin and hemoglobin S concentration on cerebral blood flow during transfusion therapy to prevent stroke in sickle cell disease. *Stroke* 25:1688–1692.

Hyacinth HI, Adams RJ, Greenberg CS, Voeks JH, Hill A, Hibbert JM and Gee BE (2015) Effect of chronic blood transfusion on biomarkers of coagulation activation and thrombin generation in sickle cell patients at risk for stroke. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0134193

INGRAM VM (1957) Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* 180:326–328.

KACZAN-BOURGOIS D, Salles JP, Hullin F, Fauvel J, Moisand A, Duga-Neulat I, Berrebi A, Campistron G and Chap H (1996) Increased content of Annexin II (p36) and p11 in human placenta brush-border membrane vesicles during syncytiotrophoblast maturation and differentiation. *Placenta* 17:669–676. doi: 10.1016/S0143-4004(96)80017-8

KASSAM G, Choi KS, Ghuman J, Kang HM, Fitzpatrick SL, Zackson T, Zackson S, Toba M, Shinomiya A and Waisman DM (1998) The role of annexin II tetramer in the activation of plasminogen. *J Biol Chem* 273:4790–4799. doi: 10.1074/jbc.273.8.4790

KATO GJ, Gladwin MT and Steinberg MH (2007) Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev* 21:37–47. doi: 10.1016/j.blre.2006.07.001

KIM HT (2007) Cumulative incidence in competing risks data and competing risks regression analysis. *Clin Cancer Res* 13:559–565. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1210

KWIATKOWSKI JL, Hunter J V, Smith-Whitley K, Katz ML, Shults J and Ohene-Frempong K (2003) Transcranial Doppler ultrasonography in siblings with sickle cell disease. *Br J Haematol* 121:932–937.

LAMBERT O, Gerke V, Bader MF, Porte F and Brisson a (1997) Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* 272:42–55. doi: 10.1006/jmbi.1997.1183

LANZKRON S, Strouse JJ, Wilson R, Beach MC, Haywood C, Park H, Witkop C, Bass EB and Segal JB (2008) Systematic review: Hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. *Ann Intern Med* 148:939–955.

LEONARDO FC, Brugnerotto AF, Domingos IF, Fertrin KY, de Albuquerque DM, Bezerra MAC, Araujo AS, Saad STO, Costa FF, Menzel S et al. (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. doi: 10.1111/bjh.13961

LETTRE G, Sankaran VG, Bezerra MAC, Araújo 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 U S A* 105:11869–74. doi: 10.1073/pnas.0804799105

LING Q, Jacovina AT, Deora A, Febbraio M, Simantov R, Silverstein RL, Hempstead B, Mark WH and Hajjar KA (2004) Annexin II regulates fibrin homeostasis and neangiogenesis in vivo. *J Clin Invest* 113:38–48. doi: 10.1172/JCI200419684

LUSHER JM, Haghghat H and Khalifa AS (1976) A prophylactic transfusion program for children with sickle cell anemia complicated by CNS infarction. *Am J Hematol* 1:265–273.

LYRA IM, Goncalves MS, Braga JAP, Gesteira M de F, Carvalho MH, Saad STO, Figueiredo MS and Costa FF (2005) Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. *Cad Saude Publica* 21:1287–1290. doi: /S0102-311X2005000400032

MACK AK and Thompson AA (2016) Primary and Secondary Stroke Prevention in Children With Sickle Cell Disease. *J Pediatr Heal Care*. doi: 10.1016/j.pedhc.2016.06.005

MACLEOD TJ, Kwon M, Filipenko NR and Waisman DM (2003) Phospholipid-associated annexin A2-S100A10 heterotetramer and its subunits. Characterization of the interaction with tissue plasminogen activator, plasminogen, and plasmin. *J Biol Chem* 278:25577–25584. doi: 10.1074/jbc.M301017200

MADUREIRA PA, Surette AP, Phipps KD, Taboski MAS, Miller VA and Waisman DM (2011) The role of the annexin A2 heterotetramer in vascular fibrinolysis. *Blood* 118:4789–4797. doi: 10.1182/blood-2011-06-334672

MAHMOUD HM, Shoeib AA-SH, Abd El Ghany SM, Reda MM and Ragab IA (2015) Study of alpha hemoglobin stabilizing protein expression in patients with beta thalassemia and sickle cell anemia and its impact on clinical severity. *Blood Cells Mol Dis* 55:358–362.

MAYHEW G and Carhart E (2015) Differential Diagnosis: Bell's Palsy vs. Stroke. They can look similar, but it's important to tell them apart. *EMS World* 44:47–53.

MINNECI PC, Deans KJ, Zhi H, Yuen PS, Star RA, Banks SM, Schechter AN, Natanson C, Gladwin MT and Solomon SB (2005) Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *J Clin Invest* 115:3409–3417. doi: 10.1172/JCI25040

MORRIS CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, Hazen SL, Vichinsky EP, Morris Jr. SM and Gladwin MT (2005) Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA* 294:81–90. doi: 10.1001/jama.294.1.81

MOSS S and Morgan R (2004) The annexins. *Genome Biol* 5:219.

NOLAN VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Ma Q, Wyszynski DF, Farrell JJ, Sebastiani P, Farrer LA and Steinberg MH (2006) Sick cell leg ulcers: Associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF- β /BMP pathway. *Br J Haematol* 133:570–578. doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06074.x

NOLAN VG, Baldwin C, Ma Q, Wyszynski DF, Amirault Y, Farrell JJ, Bisbee A, Embury SH, Farrer LA and Steinberg MH (2005) Association of single nucleotide polymorphisms in klotho with priapism in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 128:266–272. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.05295.x

OHENE-FREMPONG K (1991) Stroke in sickle cell disease: demographic, clinical, and therapeutic considerations. *Semin Hematol* 28:213–219.

OHENE-FREMPONG K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, Wethers DL, Pegelow CH and Gill FM (1998) Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* 91:288–294.

PEGELOW CH, Adams RJ, McKie V, Abboud M, Berman B, Miller ST, Olivieri N, Vichinsky E, Wang W and Brambilla D (1995) Risk of recurrent stroke in patients with sickle cell disease treated with erythrocyte transfusions. *J Pediatr* 126:896–899.

PFAFFL MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45

PHILLIPS JE and Corces VG (2009) CTCF: Master Weaver of the Genome. *Cell* 137:1194–1211. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.001

POHL U and Lamontagne D (1991) Impaired tissue perfusion after inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Basic Res Cardiol* 86 Suppl 2:97–105.

POWARS D, Wilson B, Imbus C, Pegelow C and Allen J (1978) The natural history of stroke in sickle cell disease. *Am J Med* 65:461–471.

PROHOVNIK I, Pavlakis SG, Piomelli S, Bello J, Mohr JP, Hilal S and De Vivo DC (1989) Cerebral hyperemia, stroke, and transfusion in sickle cell disease. *Neurology* 39:344–348.

REEVES SL, Madden B, Freed GL and Dombkowski KJ (2016) Transcranial Doppler Screening Among Children and Adolescents With Sickle Cell Anemia. *JAMA Pediatr*. doi: 10.1001/jamapediatrics.2015.4859

REITER CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon 3rd RO, Schechter AN and Gladwin MT (2002) Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 8:1383–1389. doi: 10.1038/nm799

RESCHER U (2004) Annexins - unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 117:2631–2639. doi: 10.1242/jcs.01245

RODRIGUES DOW, Ribeiro LC, Sudário LC, Teixeira MTB, Martins ML, Pittella AMOL and Junior I de OF (2016) Genetic determinants and stroke in children with sickle cell disease. *J Pediatr (Rio J)* 92:602–608. doi: 10.1016/j.jpmed.2016.01.010

RUSANOVA I, Cossio G, Moreno B, Javier Perea F, De Borace RG, Perea M, Escames G and Acuña-Castroviejo D (2011) β -globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Panamá. *Am J Hum Biol* 23:377–380. doi: 10.1002/ajhb.21148

SAIDI H, Smart LR, Kamugisha E, Ambrose EE, Soka D, Peck RN and Makani J (2016) Complications of sickle cell anaemia in children in Northwestern Tanzania. *Hematology* 1–9. doi: 10.1080/10245332.2015.1101976

SARNAIK S, Soorya D, Kim J, Ravindranath Y and Lusher J (1979) Periodic transfusions for sickle cell anemia and CNS infarction. *Am J Dis Child* 133:1254–1257.

SCOTHORN DJ, Price C, Schwartz D, Terrill C, Buchanan GR, Shurney W, Sarniak I, Fallon R, Chu JY, Pegelow 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. doi: 10.1067/mpd.2002.122498

SEBASTIANI P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT and Steinberg MH (2005) Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. *Nat Genet* 37:435–40. doi: 10.1038/ng1533

SHEEHAN VA, Luo Z, Flanagan JM, Howard TA, Thompson BW, Wang WC, Kutlar A, Ware RE and Investigators BH (2013) Genetic modifiers of sickle cell anemia in the BABY HUG cohort: influence on laboratory and clinical phenotypes. *Am J Hematol* 88:571–576. doi: 10.1002/ajh.23457

SINGH P (2007) Role of Annexin-II in GI cancers: Interaction with gastrins/progastrins. *Cancer Lett* 252:19–35. doi: 10.1016/j.canlet.2006.11.012

SOLH Z, Taccone MS, Marin S, Athale U and Breakey VR (2016) Neurological PREsentations in Sickle Cell Patients Are Not Always Stroke: A Review of Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome in Sickle Cell Disease. *Pediatr Blood Cancer* 63:983–989. doi: 10.1002/pbc.25932

SOLOVEY a, Gui L, Key NS and Hebbel RP (1998) Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest* 101:1899–904. doi: 10.1172/JCI1932

SPLINTER E, Heath H, Kooren J, Palstra RJ, Klous P, Grosveld F, Galjart N and De Laat W (2006) CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the β -globin locus. *Genes Dev* 20:2349–2354. doi: 10.1101/gad.399506

STEINBERG MH (2008) Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches.

ScientificWorldJournal 8:1295–1324. doi: 10.1100/tsw.2008.157

STEINBERG MH, McCarthy WF, Castro O, Ballas SK, Armstrong FD, Smith W, Ataga K, Swerdlow P, Kutlar A, DeCastro L et al. (2010) The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: A 17.5 year follow-up. *Am J Hematol* 85:403–408. doi: 10.1002/ajh.21699

STEPHENS RW, Pollanen J, Tapiovaara H, Leung KC, Sim PS, Salonen EM, Ronne E, Behrendt N, Dano K and Vaheri A (1989) Activation of pro-urokinase and plasminogen on human sarcoma cells: A proteolytic system with surface-bound reactants. *J Cell Biol* 108:1987–1995. doi: 10.1083/jcb.108.5.1987

STOCKMAN JA, Nigro MA, Mishkin MM and Oski FA (1972) Occlusion of large cerebral vessels in sickle-cell anemia. *N Engl J Med* 287:846–849. doi: 10.1056/NEJM197210262871703

STRAM DO (2004) Tag SNP selection for association studies. *Genet Epidemiol* 27:365–374. doi: 10.1002/gepi.20028

STROUSE JJ, Lanzkron S, Beach MC, Haywood C, Park H, Witkop C, Wilson RF, Bass EB and Segal JB (2008) Hydroxyurea for sickle cell disease: a systematic review for efficacy and toxicity in children. *Pediatrics* 122:1332–1342. doi: 10.1542/peds.2008-0441

STROUSE JJ, Lanzkron S and Urrutia V (2011) The epidemiology, evaluation and treatment of stroke in adults with sickle cell disease. *Expert Rev Hematol* 4:597–606. doi: 10.1586/EHM.11.61

STUART MJ and Nagel RL (2004) Sickle-cell disease. *Lancet* 364:1343–1360. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17192-4

SURETTE AP, Madureira PA, Phipps KD, Miller VA, Svenningsson P and Waisman DM (2011) Regulation of fibrinolysis by S100A10 in vivo. *Blood* 118:3172–3181. doi: 10.1182/blood-2011-05-353482

SWITZER JA, Hess DC, Nichols FT and Adams RJ (2006) Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. *Lancet Neurol* 5:501–512. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70469-0

TANAKA KA, Key NS and Levy JH (2009) Blood coagulation: Hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg* 108:1433–1446. doi: 10.1213/ane.0b013e31819bcc9c

UPADHYE D, Jain D, Trivedi Y, Nadkarni A, Ghosh K and Colah R (2016a) Influence of single nucleotide polymorphisms in the BCL11A and HBS1L-MYB gene on the HbF levels and clinical severity of sickle cell anaemia patients. *Ann Hematol* 95:1201–3. doi: 10.1007/s00277-016-2675-1

UPADHYE DS, Jain DL, Trivedi YL, Nadkarni AH, Ghosh K and Colah RB (2016b) Neonatal Screening and the Clinical Outcome in Children with Sickle Cell Disease

- in Central India. PLoS One 11:e0147081. doi: 10.1371/journal.pone.0147081
- Venkatasubramanian N, Prohovnik I, Hurllet A, Mohr JP and Piomelli S (1994) Middle cerebral artery velocity changes during transfusion in sickle cell anemia. *Stroke* 25:2153–2158.
- WAISMAN DM (1995) Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem* 149–150:301–322. doi: 10.1007/BF01076592
- WARE RE, de Montalembert M, Tshilolo L and Abboud MR (2017) Sickle cell disease. *Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30193-9
- WARE RE, Helms RW and Investigators SW (2012) Stroke With Transfusions Changing to Hydroxyurea (SWITCH). *Blood* 119:3925–3932. doi: 10.1182/blood-2011-11-392340
- WILIMAS J, Goff JR, Anderson Jr. HR, Langston JW and Thompson E (1980) Efficacy of transfusion therapy for one to two years in patients with sickle cell disease and cerebrovascular accidents. *J Pediatr* 96:205–208.
- WYSZYNSKI DF, Baldwin CT, Cleves MA, Amirault Y, Nolan VG, Farrell JJ, Bisbee A, Kutlar A, Farrer LA and Steinberg MH (2004) Polymorphisms near a chromosome 6q QTL area are associated with modulation of fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia. *Cell Mol Biol* 50:23–33.
- ZHANG L, Fogg DK and Waisman DM (2004) RNA Interference-mediated Silencing of the S100A10 Gene Attenuates Plasmin Generation and Invasiveness of Colo 222 Colorectal Cancer Cells. *J Biol Chem* 279:2053–2062. doi: 10.1074/jbc.M310357200
- ZHOU Z, Behymer M and Guchhait P (2011) Role of extracellular hemoglobin in thrombosis and vascular occlusion in patients with sickle cell anemia. *Anemia* 2011:918916. doi: 10.1155/2011/918916

ANEXO I PARECER SUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de polimorfismos em genes relacionados ao estresse oxidativo e inflamação no desenvolvimento da doença cerebrovascular em pacientes com anemia falciforme

Pesquisador: Igor de Farias Domingos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 21722613.7.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 413.574

Data da Relatoria: 02/10/2013

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de *Notificação* e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado.

RECIFE, 02 de Outubro de 2013

Assinador por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

TABELA SUPLEMENTAR I

Tabela Suplementar I. Lista de SNPs marcados pelo Tag-SNP IVS-14-1046 C>T (rs7163836) baseado na população YRI e CEU

YRI	CEU
rs28508289	rs28508289
rs12900365	rs12900365
	rs7165285
	rs4775261
	rs4775260
	rs28437402
	rs10851677
	rs12440018
	rs28771688
	rs28870083
	rs28642929
	rs60009618
	rs2136554
	rs1033028
	rs1463329
	rs8030787
	rs8030804
	rs28676840
	rs11071522

APÊNDICE A

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

Convidamos você (após o consentimento do (a) seu/sua pai/mãe ou responsável legal) para participar, como voluntário (a), da pesquisa “Avaliação da influência do polimorfismo IVS-14-1046 no gene ANXA2 com o desenvolvimento do acidente vascular cerebral em pacientes pediátricos com anemia falciforme”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Rayssa Leal Borges de Medeiros (Endereço: Rua Professora Anice de Oliveira, 387, Janga, Paulista - PE, CEP: 53439-140 Fone: (81) 99512-8668 – e-mail: medeirosrayssa@hotmail.com) e sob a orientação do professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra ((81) 99800-8105 - macbezerra@bol.com.br). Também participam desta pesquisa: Dr. Aderson da Silva Araújo ((81) 99976-5136 - aderson@hotlink.com.br), Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo ((81) 99800-9382 - araujoarl@hotmail.com) e Igor Farias Domingos ((81) 99609-5839 - domingos_if@hotmail.com).

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Você tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

Nós verificamos que a anemia falciforme é uma doença de grande incidência que altera os glóbulos vermelhos e que provoca dores, o que pode estar interferindo em suas atividades do dia a dia. Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, a identificação de alterações genéticas na anemia falciforme permitirá a detecção precoce de eventos cerebrovasculares, levando a melhoria do serviço prestado e ao aumento da qualidade de vida dos pacientes. Dessa forma, gostaríamos que você doasse 5 ml de sangue, obtidos usando agulhas e seringas descartáveis. O risco por nós avaliado para o paciente é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (entrevistas e dados laboratoriais) ficarão armazenados em computador pessoal sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos.

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

(Assinatura do pesquisador)

Avaliação da influência do polimorfismo IVS-14-1046 no gene ANXA2 com o desenvolvimento do acidente vascular cerebral em pacientes pediátricos com anemia falciforme

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

Eu, _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar no estudo "Avaliação da influência do polimorfismo IVS-14-1046 no gene ANXA2 com o desenvolvimento do acidente vascular cerebral em pacientes pediátricos com anemia falciforme", como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade para mim ou para meu/minha pai/mãe ou responsável legal.

Local e data

Assinatura do (a) menor

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE B

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

Convidamos o (a) seu/sua filho (a) ou menor de idade que está sob sua responsabilidade para participar, como voluntário (a), da pesquisa da pesquisa “Avaliação da influência do polimorfismo IVS-14-1046 no gene ANXA2 com o desenvolvimento do acidente vascular cerebral em pacientes pediátricos com anemia falciforme”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Rayssa Leal Borges de Medeiros (Endereço: Rua Professora Anice de Oliveira, 387, Janga, Paulista - PE, CEP: 53439-140 Fone: (81) 99512-8668 – e-mail: medeirosrayssa@hotmail.com) e sob a orientação do professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra ((81) 99800-8105 - macbezerra@bol.com.br). Também participam desta pesquisa: Dr. Aderson da Silva Araújo ((81) 99976-5136 - aderson@hotlink.com.br), Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo ((81) 99800-9382 - araujoarl@hotmail.com) e Igor Farias Domingos ((81) 99609-5839 - domingos_if@hotmail.com).

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar que seu/sua filho (a) faça parte do estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, nem o (a) Sr. (a) ou o (a) seu/sua filho (a) serão penalizados (as) de forma alguma. O (A) Sr. (a) tem o direito de retirar o consentimento da participação dele (a) a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

Nós verificamos que a anemia falciforme é uma doença de grande incidência que altera os glóbulos vermelhos e que provoca dores, o que pode estar interferindo em suas atividades do dia a dia. Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, a identificação de alterações genéticas na anemia falciforme permitirá a detecção precoce de eventos cerebrovasculares, levando a melhoria do serviço prestado e ao aumento da qualidade de vida dos pacientes. Dessa forma, gostaríamos que seu/sua filho (a) doasse 5 ml de sangue, obtidos usando agulhas e seringas descartáveis. O risco por nós avaliado para o paciente é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (entrevistas e dados laboratoriais) ficarão armazenados em computador pessoal sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para o (a) seu/sua filho (a) participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em

Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

(Assinatura do pesquisador)

Avaliação da influência do polimorfismo IVS-14-1046 no gene ANXA2 com o desenvolvimento do acidente vascular cerebral em pacientes pediátricos com anemia falciforme

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

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, responsável pelo (a) menor _____, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, autorizo a sua participação no estudo “Avaliação da influência do polimorfismo IVS-14-1046 no gene ANXA2 com o desenvolvimento do acidente vascular cerebral em pacientes pediátricos com anemia falciforme”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação dele (a). Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade para mim ou para meu/minha filho (a).

Local e data

Assinatura do (a) responsável legal

Impressão Digital

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

CURRICULUM VITAE (LATTES)

Rayssa Leal Borges de Medeiros

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2614615977036047>

Resumo informado pelo autor

Graduada em Biomedicina pela Universidade Federal de Pernambuco - UFPE (2015). Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Genética - PPGG, sendo bolsista CNPq/UFPE com projeto intitulado 'Avaliação da influência do polimorfismo IVS-14-1046 no gene ANXA2 com o desenvolvimento do acidente vascular cerebral em pacientes pediátricos com anemia falciforme', além de participar do grupo de pesquisa 'Fatores Genéticos Moduladores da Gravidade Clínica na Anemia Falciforme', desenvolvido no Laboratório Central do Centro de Biociências da UFPE em colaboração com a Fundação HEMOPE.

(Texto informado pelo autor)

Formação acadêmica/titulação

2015 Mestrado em Genética.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Título: Avaliação de polimorfismos no gene ANXA2 com o desenvolvimento do acidente vascular cerebral em pacientes com anemia falciforme

Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Co-orientador: Antonio Roberto Lucena de Araujo

Bolsista do (a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2011 - 2015 Graduação em Biomedicina.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Título: Avaliação de Polimorfismos em Genes Inflamatórios nas Alterações Cerebrovasculares de Pacientes com Anemia Falciforme

Orientador: Igor de Farias Domingos

Formação complementar

2015 - 2015 Curso de curta duração em PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR). (Carga horária: 6h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Vínculo institucional

2015 - 2015 Vínculo: Voluntário. Enquadramento funcional: Monitora, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Outras informações: Monitora do módulo 'Série Leucocitária - Teórica/Prática - no curso de Pós-Graduação Lato sensu em Hematologia e Hemoterapia laboratorial do CCE

Prêmios e títulos

2016 Menção Honrosa, XXI Encontro de Genética do Nordeste (ENGINE)

Produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Borges-Medeiros, R.L.; MARTINS, D. A. P.; HATZLHOFER, B. L. D.; DOMINGOS, I. F.; AZEVEDO, R. C.; ANJOS, A. C.; PERES, J. C.; ARAUJO, A. S.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C. Associação Do Polimorfismo Ivs-14-1046 C>T No Gene Anxa2 Com O Desenvolvimento Do Acidente Vascular Cerebral Em Pacientes Pediátricos Com Anemia Falciforme In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Associação Do Polimorfismo Ivs-14-1046 C>T No Gene Anxa2 Com O Desenvolvimento Do Acidente Vascular Cerebral Em Pacientes Pediátricos Com Anemia Falciforme, 2016.

2. DOMINGOS, I. F.; MARTINS, D. A. P.; COELHO, J. L.; Borges-Medeiros, R.L.; FALCAO, D. A.; AZEVEDO, R. C.; ANJOS, A. C.; BELMONT, T. F. M.; CAVALCANTI, M. S. M.; ARAUJO, A. S.; LUCENA- ARAUJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C.

Association between interleukin-6 G- 174C polymorphism and stroke development in sickle cell anemia In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Association between interleukin-6 G- 174C polymorphism and stroke development in sickle cell anemia. 2016.

3. Borges-Medeiros, R.L.; PEREIRA-MARTINS, D. A.; DOMINGOS, I. F.; HATZLHOFER, B. L. D.; AZEVEDO, R. C.; ANJOS, A. C.; CUNHA, A. F.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C.

Avaliação de Polimorfismos No Gene Anxa2 Com O Desenvolvimento do Acidente Vascular Cerebral em Pacientes com Anemia Falciforme In: congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2016, Florianópolis.

Avaliação de Polimorfismos No Gene Anxa2 Com O Desenvolvimento do Acidente Vascular Cerebral em Pacientes com Anemia Falciforme. 2016.

4. DOMINGOS, I. F.; PEREIRA-MARTINS, D. A.; Borges-Medeiros, R.L.; FALCAO, D. A.; HATZLHOFER, B. L. D.; BELMONT, T. F. M.; CAVALCANTI, M. S. M.; CUNHA, A. F.; AZEVEDO, R. C.; ARAUJO, A. S.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C.

Influence of SOD2 VAL16ALA Polymorphism on Stroke Development in a Sickle Cell Anemia Brazilian Population In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Influence of SOD2 VAL16ALA Polymorphism on Stroke Development in a Sickle Cell Anemia

Brazilian Population. 2016. v.2016. p.233 - 233

5. HATZLHOFER, B. L. D.; PEREIRA-MARTINS, D. A.; DOMINGOS, I. F.; FALCAO, D. A.; Borges- Medeiros, R.L.; BATISTA, J. V. G. F.; SOUZA, M. B. S.; ARAUJO, A. S.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C.

Influência dos Haplótipos β S e da Talassemia Alfa no Perfil Clínico da Anemia Falciforme em Pernambuco, Brasil In: Congresso de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2016, Florianópolis.

Influência dos Haplótipos β S e da Talassemia Alfa no Perfil Clínico da Anemia Falciforme em Pernambuco, Brasil, 2016.

6. XAVIER, A. L.; BATISTA, T. H. C.; SANTANA, R. M.; PACHECO, M. F. T.; ARCANJO, G. S.; Borges- Medeiros, R.L.; HATZLHOFER, B. L. D.; MARTINS, D. A. P.; ANJOS, A. C.; ARAUJO, A. S.; LUCENA- ARAUJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C.

Inheritance of the Bantu/Bantu haplotype cause more severe hemolysis and inflammatory response in children with sickle cell anemia diagnosed through the newborn screening program In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

Inheritance of the Bantu/Bantu haplotype cause more severe hemolysis and inflammatory response in children with sickle cell anemia diagnosed through the newborn screening program. 2016.

7. BATISTA, J. V. G. F.; MARTINS, D. A. P.; MEDEIROS, R. L. B.; PRADO, L. L.; FALCAO, D. A.; DOMINGOS, I. F.; HATZLHOFER, B. L. D.; SOUZA, M. B. S.; CUNHA, A. F.; COSTA, F. F.; ARAUJO, A. S.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C.

Klotho Gene Polymorphisms and Their Association With Clinical Manifestations In Patients With Sickle Cell Anemia In: 21^o Congress of European Hematology Association, 2016, Copenhagen.

Klotho Gene Polymorphisms and Their Association With Clinical Manifestations In Patients With Sickle Cell Anemia. 2016.

8. PRADO, L. L.; MARTINS, D. A. P.; FALCAO, D. A.; FARIAS, I. C. C.; DOMINGOS, I. F.; MEDEIROS, R. L. B.; CALLADO, F. M. R. A.; ARAUJO, A. S.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C.

Investigação dos Polimorfismos em Genes da Via do TGF β na Ocorrência de Úlcera Maleolares em Pacientes com Anemia Falciforme In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2015, São Paulo.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2015.

9. PRADO, L. L.; FALCAO, D. A.; MARTINS, D. A. P.; FARIAS, I. C. C.; DOMINGOS, I. F.; MEDEIROS, R. L. B.; HATZLHOFER, B. L. D.; ARAUJO, A. S.; LUCENA-ARAÚJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C.

Perfil Laboratorial e Molecular dos Pacientes com Anemia Falciforme que desenvolveram Úlceras de Membros Inferiores, do Estado de Pernambuco In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2015, São Paulo.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2015.

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Pôster / Painel no (a) Congresso Brasileiro de Hemoterapia, Hematologia e Terapia Celular., 2016. (Congresso)

Avaliação de Polimorfismos no Gene Anxa2 com o Desenvolvimento do Acidente Vascular Cerebral em Pacientes com Anemia Falciforme.

2. V Jornada de Pós-Graduação em Genética, 2016. (Encontro)

3. Congresso Brasileiro de Hemoterapia, Hematologia e Terapia Celular, 2015. (Congresso)

Organização de evento

1. MEDEIROS, R. L. B.

IV Curso de Flebotomia e Técnicas Hematológicas, 2015. (Outro, Organização de evento)

2. MEDEIROS, R. L. B.

V Curso de Flebotomia e Técnicas Hematológicas, 2015. (Outro, Organização de evento)

3. Borges-Medeiros, R.L.

V Jornada de Pós-Graduação em Genética, 2015. (Congresso, Organização de evento)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos	13
Apresentações de trabalhos (Congresso)	1

Eventos

Participações em eventos (congresso)	4
Participações em eventos (simpósio)	1
Participações em eventos (encontro)	1
Organização de evento (congresso)	1
Organização de evento (outro)	5