

André Rolim Belisário

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE MARCADORES
GENÉTICOS, LABORATORIAIS E CLÍNICOS NA OCORRÊNCIA
DE DOENÇA CEREBROVASCULAR EM CRIANÇAS COM
ANEMIA FALCIFORME TRIADAS PELO PROGRAMA DE
TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS E
ACOMPANHADAS NO HEMOCENTRO DE BELO HORIZONTE
DA FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Belo Horizonte
2015

André Rolim Belisário

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE MARCADORES GENÉTICOS, LABORATORIAIS
E CLÍNICOS NA OCORRÊNCIA DE DOENÇA CEREBROVASCULAR EM CRIANÇAS
COM ANEMIA FALCIFORME TRIADAS PELO PROGRAMA DE TRIAGEM
NEONATAL DE MINAS GERAIS E ACOMPANHADAS NO HEMOCENTRO DE BELO
HORIZONTE DA FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Área de Concentração Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito parcial para obtenção do título do doutor.

Orientador: Prof. Marcos Borato Viana

Co-orientadora: Prof^a. Cibele Velloso Rodrigues

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Belo Horizonte
2015

B431a Belisário, André Rolim.
Avaliação da influência de marcadores genéticos, laboratoriais e clínicos na ocorrência de doença cerebrovascular em crianças com anemia falciforme triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais... [manuscrito]. / André Rolim Belisário. - - Belo Horizonte: 2015. 263f.: il.
Orientador: Marcos Borato Viana.
Coorientador: Cibele Velloso Rodrigues.
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Anemia Falciforme/complicações. 2. Acidente Vascular Cerebral. 3. Ultrassonografia Doppler Transcraniana. 4. Fatores de Risco. 5. Estudos de Coortes. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Viana, Marcos Borato. II. Rodrigues, Cibele Velloso. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WS 300

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Pós-graduação em Ciências da Saúde
Área de Concentração Saúde da Criança e do Adolescente

Reitor: Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora: Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-reitor de Pós-Graduação: Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró-reitor de Pesquisa: Prof^a. Adelina Martha dos Reis

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Humberto José Alves

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Sandhi Maria Barreto

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Ana Cristina Cortes

Chefe do Departamento de Pediatria: Prof^a. Cláudia Regina Lindgren Alves

Subchefe do Departamento de Pediatria: Prof^a. Rachel Aparecida Ferreira Fernandes

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de
Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente: Prof. Eduardo Araújo Oliveira

Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Área de
Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente: Prof. Jorge Andrade Pinto

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em
Saúde da Criança e do Adolescente:

Prof. Eduardo Araújo de Oliveira - Titular

Prof^a. Eleonora Moreira Lima - Suplente

Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira - Titular

Prof. Cássio da Cunha Ibiapina - Suplente

Prof. Jorge Andrade Pinto - Titular

Prof^a. Helena Maria Gonçalves Becker – Suplente

Prof^a. Juliana Gurgel – Titular

Prof^a. Ivani Novato Silva - Suplente

Prof^a. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana – Titular

Prof^a. Luana Caroline dos Santos - Suplente

Prof. Sérgio Veloso Brant Pinheiro – Titular

Prof. Marcos José Burle de Aguiar - Suplente

Prof^a. Roberta Maia de Castro Romanelli – Titular

Prof^a. Débora Marques de Miranda - Suplente

*“A ciência não pode prever o que vai acontecer.
Só pode prever a probabilidade de algo
acontecer.”*

César Lattes

*Às pessoas com doença falciforme, minha eterna
admiração pela devoção à vida.*

Agradecimentos

Inicialmente a Deus, que sempre iluminou meus caminhos e por me fazer muito feliz.

Aos participantes do estudo e seus pais ou responsáveis, pela contribuição e confiança depositada no nosso grupo de pesquisa.

Aos acadêmicos de Ciências Biológicas Ana Luiza Moreira Cattabriga, Rahyssa Sales Rodrigues, Nayara Evelin Toledo e Paulo Orsini pela imprescindível contribuição na realização dos procedimentos laboratoriais e na coleta dos termos de consentimento. Sem vocês, este trabalho nunca sairia do papel.

Ao Professor Marcos Borato Viana, pela competência, exemplo profissional, dedicação incondicional e pelo direcionamento preciso na orientação, facilitando bastante a conclusão deste trabalho.

À minha coorientadora Cibele Velloso Rodrigues, pela presença maternal desde a época da graduação, que me trouxe conforto nos momentos confusos com sábios conselhos. Por ter orientado este trabalho com sabedoria e dedicação, incentivando sempre o meu aprendizado. Especialmente, pela realização das análises *in silico*, de fundamental importância para consolidar os resultados alcançados.

À Celia Maria Silva, pela dedicação impar ao cuidado das crianças com doença falciforme. Pelo árduo trabalho de rastreamento das crianças com doença falciforme pelo Doppler, atividade imprescindível para realização deste trabalho. E, principalmente, pelo exemplo de simplicidade, humildade e humanismo.

Aos meus pais, Carlos Henrique Torres Belisário e Maria Cristina Rolim Belisário, pelo amor, incentivo, cuidado e dedicação. Por não medirem esforços para me proporcionar educação de qualidade. Desculpas pelos momentos que não pude dar atenção que merecem e pela constante ausência devido a dedicação ao trabalho.

À Kelme Cristina Fernandes, pela paciência, compreensão, companheirismo e, principalmente, pelo amor.

À minha irmã, Gabriela Rolim Belisário, pelo companheirismo e, principalmente, por ter me dado a Gabizinha e o João.

A todos os meus amigos e familiares, pelo apoio, paciência e, principalmente, por acreditarem em mim.

Ao Frederico Lisboa Nogueira e Filipe Otávio Chaves Duarte pela essencial contribuição na alimentação do banco de dados e auxílio na coleta dos termos de consentimento, mesmo tendo que se dedicarem concomitantemente ao exigente curso de medicina.

À funcionária do NUPAD Ivanir, pelo seu importantíssimo, indispensável e generoso apoio na coleta dos termos de consentimento.

À direção da Fundação Hemominas e a coordenação do Cetebio, pela confiança depositada em mim e pela compressão, permitindo que eu me dedicasse ao doutoramento.

Aos colegas do Cetebio, pelo incentivo, compreensão e, principalmente, pela paciência com relação às minhas ausências para dedicação à pós-graduação.

Aos colegas do Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas, que me ajudaram, incentivaram e com quem muito aprendi.

Ao pessoal do Serviço de Hematologia e Coagulação da Fundação Hemominas, pelo apoio na coleta das amostras dos participantes da pesquisa.

Ao pessoal da recepção do ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas, pela paciência e colaboração.

Ao NUPAD, pelo apoio logístico e financeiro.

À Fundação Hemominas, por ceder o espaço logístico e pelo financiamento.

À FAPEMIG, inicialmente, pelo financiamento do projeto. Por financiar as bolsas de iniciação científica dos estudantes que contribuíram com a realização do trabalho e pelo financiamento dos meus cursos de capacitação.

À CAPES, pelo financiamento da bolsa de doutorado.

E a todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento e concretização deste trabalho.

A todos, meu sincero obrigado.

Resumo

A doença cerebrovascular (DCV) é uma complicação grave associada à anemia falciforme. O doppler transcraniano (DTC) anormal identifica algumas criança sob alto risco de desenvolvimento, mas outros marcadores seriam úteis. **Objetivo:** Este estudo de coorte teve como objetivo avaliar os efeitos de marcadores clínicos, laboratoriais e genéticos no risco de desenvolvimento de DCV em crianças de Minas Geras, Brasil. Um objetivo secundário foi identificar as mutações de beta-talassemia causadoras de S β -talassemia na coorte de recém-nascidos do estado de Minas Gerais. **Métodos:** Os desfechos estudados foram acidente vascular cerebral isquêmico clinicamente manifesto (AVC) e DTC alto risco. Os possíveis marcadores genéticos foram genotipados por PCR/RFLP. Os dados clínicos e hematológicos foram retirados dos prontuários médicos das crianças. A determinação da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) foi realizada usando um ensaio enzimático colorimétrico. A análise molecular do gene *HBB* foi realizada por sequenciamento de DNA. **Resultados:** De 440 crianças, 395 (89,8%) tiveram o genótipo Hb SS, 28 (6,4%) eram Hb S β^0 -talassemia (S β^0 -tal), 13 (3%) eram Hb S/persistência hereditária de hemoglobina fetal e quatro (0,9%) eram Hb S β^+ -talassemia (S β^+ -tal). Nas crianças Hb SS, a incidência cumulativa de AVC aos 8 anos de idade foi 7,4% (IC 95%, 4,66%–10,14%) e a incidência cumulativa de DTC alto risco aos 11,5 anos de idade foi 14,2% (IC 95% 8,91%–19,49%). **Artigo 1:** Nenhum efeito do polimorfismo VCAM-1 c.1238G>C no risco de AVC ou DCV foi encontrado. A incidência cumulativa de AVC foi significativamente maior em crianças com o alelo TNF- α -308A ($p=0,02$) e menor em crianças com deleções nos genes *HBA* ($p=0,02$). Entretanto, não foi encontrada associação entre DCV e o polimorfismo TNF- α -308G>A. A incidência cumulativa de DCV foi significativamente menor em crianças com deleções nos genes *HBA* ($p=0,004$). **Artigo 2:** A frequência de AVC foi nula (0/83) em crianças com o genótipo *ENPP1* KK, 6,8% (7/103) para crianças com o genótipo QQ e 7,7% (16/209) para crianças com o genótipo KQ ($P=0,037$). A probabilidade cumulativa de AVC foi significativamente maior em crianças com o genótipo QQ quando comparado com as crianças com o genótipo KK ($P=0,015$). Resultados semelhantes foram obtidos quando comparado os genótipos QQ/KQ versus o genótipo KK. Nenhuma associação entre *GOLGB1* Y1212C ou *PONI* Q192R e AVC ou risco de AVC foi encontrada. **Artigo 3:** O modelo multivariado final de risco de AVC incluiu contagem de leucócitos, contagem de reticulócitos, taxa de síndrome torácica aguda e os polimorfismos *TEK* rs489347 e *TNF- α* rs1800629. O modelo para DTC de alto risco incluiu contagem de reticulócitos e os polimorfismos *TEK* rs489347 e *TGFBR3* rs284875. **Artigo 4:** a prevalência global de deficiência molecular de G6PD foi 4,3% (IC95% 2,3%-6,3%). A média da atividade de G6PD foi 16,88 U/g Hb [erro padrão da média (EPM) 0,28] no grupo sem deficiência molecular de G6PD e 8,43 U/g Hb (EPM 1,01) no grupo com deficiência molecular G6PD A. A presença de deficiência molecular de G6PD não influenciou o nível médio de parâmetros hematológicos. Não foi detectado nenhum efeito da deficiência molecular de G6PD no risco de ocorrência de AVC ou DTC de alto risco. A média da atividade de G6PD foi similar nas crianças que apresentaram AVC e nas sem AVC. Resultados similares foram obtidos na análise comparando crianças que tiveram DTC de alto risco e as crianças sem DTC de alto risco. **Artigo 5:** Treze crianças forma incluídas, nove (69,2%) tiveram o genótipo Hb S/HPFH-2 e quatro (30,8%) tiveram Hb S/HPFH-1; onze crianças (84,6%) eram $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ e duas (15,4%) $\alpha\alpha/\alpha$ ^{3,7}. A concentração média de Hb e Hb F foi $12,52 \pm 0,56$ g/dl e $42,31\% \pm 1,97\%$, respectivamente. Todas as crianças tiveram DTC de baixo risco. **Artigo 6:** a análise dos haplótipos de *IL-10* na nossa coorte mostrou que 99 (25,1%) crianças eram GCC/ATA, 85 (21,5%) ACC/ATA, GCC/ACC 79 (20%), GCC/GCC 50 (12,7%) ATA/ATA 47 (11,9%), ACC/ACC 34 (8,6%), e uma (0,3%) criança apresentou

um haplótipo incomum (GCC/GTA). Não houve diferença significativa nas frequências dos polimorfismos na região promotora do gene de *IL-10* entre as crianças com e sem AVC ou DTC de alto risco. Do mesmo modo, nenhuma associação entre os haplótipos de *IL-10* e AVC ou DTC de alto risco foi encontrada. **Artigo 7:** De 54 crianças S β -tal, 14 (25,9%) apresentaram a mutação códon 39 (C>T), 12 (22,2%) a mutação IVS-I-1 (G>A), oito (14,8%) a mutação IVS-I-6 (T>C), cinco (9,3%) a mutação -29 (A>G TATA box), três (5,6%) a mutação IVS-II-1 (G>A), três (5,6%) a mutação IVS-I-110 (G>A), duas (3,7%) a mutação -92 (C>T), duas (3,7%) apresentaram as mutações IVS-II-844 (C>A) e IVS-II-839 (T>C) em *cis*, duas (3,7%) a mutação IVS-I-5 (G>A), uma (1,9%) a mutação -88 (C>T), uma (1,9%) a mutação poly A signal (T>C) e uma (1,9%) criança apresentou a mutação IVS-I-2 (T>C). **Artigo 8:** Duas crianças tiveram a mutação -92 (C>T) e duas apresentaram as mutações IVS-II-844 (C>A) e IVS-II-839 (T>C) em *cis*. A média da concentração de hemoglobina foi 12,0 \pm 0,7 g/dL e a média da concentração de hemoglobina A foi 40,4 \pm 1,1%. Todas as crianças foram oligossintomáticas e nenhum teve complicações clínicas atribuíveis à doença falciforme. As mutações -92 (C>T) e IVS-II-844 (C>A)/IVS-II-839 (T>C) associadas ao alelo β^S causam formas silenciosas de S β^+ -tal. **Conclusões:** Nosso estudo identificou fatores de risco clínicos, laboratoriais e moleculares para o desenvolvimento de AVC e DCV em crianças com anemia falciforme da coorte de recém-nascidos do estado de Minas Gerais. Minas Gerais é o segundo estado brasileiro mais heterogêneo em termos de mutações causadoras de beta-talassemia e tem um padrão relativamente diferente quando comparado com as outras regiões brasileiras.

Abstract

Cerebrovascular disease (CVD) is a severe complication associated with sickle cell anemia (SCA). Abnormal transcranial Doppler (TCD) identifies some children at high risk, but other markers would be helpful. **Objectives:** This cohort study was aimed at evaluating the effects of clinical, laboratorial, and molecular biomarkers on the risk of developing CVD in children from Minas Gerais, Brazil. A secondary aim was to identify the β -thal mutations causing $S\beta$ -thalassemia in the newborn cohort of Minas Gerais state. **Methods:** Outcomes studied were overt ischemic stroke, and high-risk TCD. Possible genetic markers were genotyped by PCR/RFLP. Clinical and hematological data were retrieved from children's records. The quantitative determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity was performed using an enzymatic colorimetric assay. The molecular analysis of *HBB* was performed by DNA sequencing. **Results:** Out of 440 children, 395 (89.8%) had Hb SS genotype, 28 (6.4%) had Hb $S\beta^0$ -thal, 13 (3%) had Hb S/hereditary persistency of fetal hemoglobin (HPFH), and four (0.9%) Hb $S\beta^+$ -thal. In Hb SS children, the cumulative incidence of clinical ischemic stroke by 8.0 years of age was 7.4% (95% CI, 4.66–10.14%) and that of high-risk TCD by 11.5 years of age was 14.2% (95% CI, 8.91–19.49%). **Paper 1:** No effect of VCAM-1 c.1238G>C single nucleotide polymorphism (SNP) on stroke or CVD risks was detected. Cumulative incidence of stroke was significantly higher for children with TNF- α -308A allele ($p=0.02$) and lower for children with *HBA* deletion ($p=0.02$). However, no association between CVD and TNF- α -308G>A was found. CVD cumulative incidence was significantly lower for children with *HBA* deletion ($p=0.004$). **Paper 2:** The frequency of stroke was null (0/83) for children who harbored the *ENPP1* KK genotype, 6.8% (7/103) for those with QQ genotype, and 7.7% (16/209) for children with KQ genotype ($P=0.037$). The cumulative probability of stroke was significantly ($P=0.015$) higher for children with the QQ genotype than for those with the KK genotype. Similar results were obtained comparing QQ/KQ genotypes as one group with the KK group. No association between *GOLGB1* Y1212C or *PONI* Q192R and stroke or stroke risk was detected. **Paper 3:** The final multivariate model for stroke risk included high white blood cell count and reticulocyte count, acute chest syndrome rate, and the single nucleotide polymorphisms (SNPs) *TEK* rs489347 and *TNF- α* rs1800629. The model for high-risk TCD included high reticulocyte count and the SNPs *TEK* rs489347 and *TGFBR3* rs284875. **Paper 4:** The prevalence of molecularly-defined deficiency was 4.3% (95%CI: 2.3%–6.3%). The mean G6PD activity was 16.88 U/g Hb [standard error of the mean (SEM) 0.28] in the group without G6PD molecular deficiency and 8.43 (SEM 1.01) U/g Hb in the group with G6PD A^- molecular deficiency. G6PD molecular deficiency was not associated with any hematological features. No effects of G6PD molecular deficiency on clinical ischemic stroke or high-risk TCD were detected. The mean G6PD activity was similar in children who had clinical ischemic stroke and in those without stroke. Similar results were obtained in analyses comparing children who had high-risk TCD and those without high-risk TCD. **Paper 5:** Thirteen children were included, nine (69.2%) had the Hb S/HPFH deletion type 2, and four (30.8%) had deletion type 1; eleven children (84.6%) were $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, and two (15.4%) $\alpha\alpha/\alpha^{3.7}$. The mean concentration of total hemoglobin (Hb) and Hb F was 12.52 ± 0.56 g/dl and $42.31\% \pm 1.97\%$, respectively. All children were classified as having low-risk transcranial Doppler. **Paper 6:** Analysis of *IL-10* haplotype in our cohort showed that 99 (25.1%) children were GCC/ATA, 85 (21.5%) ACC/ATA, GCC/ACC 79 (20%), GCC/GCC 50 (12.7%) ATA/ATA 47 (11.9%), ACC/ACC 34 (8.6%), and one (0.3%) child presented an uncommon haplotype (GCC/GTA). There was no significant difference in the frequencies of SNPs in the promoter region of *IL-10* gene between children with and without stroke or high-risk TCD. Likewise, no association was observed between *IL-10*

haplotypes and stroke or high-risk TCD. **Paper 7:** Out of 54 S β -thal children, 14 (25.9%) children had the codon 39 (C>T) mutation, 12 (22.2%) had IVS-I-1 (G>A), eight (14.8%) had IVS-I-6 (T>C), five (9.3%) had -29 (A>G TATA box), three (5.6%) had IVS-II-1 (G>A), three (5.6%) had IVS-I-110 (G>A), two (3.7%) had -92 (C>T), two (3.7%) had IVS-II-844 (C>A) and IVS-II-839 (T>C) in *cis* mutations, two (3.7%) had IVS-I-5 (G>A), one (1.9%) had -88 (C>T), one (1.9%) had poly A signal (T>C), and one child (1.9%) had IVS-I-2 (T>C) mutation. **Paper 8:** Two children had a -92 (C>T) mutation and two had IVS-II-844 (C>A) plus IVS-II-839 (T>C) *in cis* mutations. The mean hemoglobin concentration was 12.0 \pm 0.7 g/dL and the mean hemoglobin A concentration was 40.4 \pm 1.1%. All the children were clinically oligosymptomatic and none of them had complications attributable to sickle cell disease. The -92 (C>T) and IVS-II-844 (C>A)/IVS-II-839 (T>C) mutations associated with the β^S allele lead to a silent form of S β^+ -thal. **Conclusions:** Our study identified clinical, laboratorial, and molecular risk factors for stroke and CVD development in children from the Minas Gerais state SCA newborn cohort, Brazil. The Minas Gerais state is the second most heterogeneous state in Brazil in terms of β -thal mutations and has a relatively different molecular pattern when compared to other Brazilian regions.

Sumário

Resumo	viii
Abstract	x
Lista de abreviaturas e siglas	xiv
Lista de tabelas	xviii
Lista de quadros	xix
Lista de figuras	xx
1. APRESENTAÇÃO.....	22
2. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	22
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	26
4. OBJETIVOS.....	54
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
7. ARTIGO 1.....	106
8. ARTIGO 2.....	126
9. ARTIGO 3.....	130
10. ARTIGO 4.....	152
11. ARTIGO 5.....	169
12. ARTIGO 6.....	181

13. ARTIGO 7.....	194
14. ARTIGO 8.....	208
15. CONCLUSÕES.....	217
16. ANEXOS.....	219

Lista de abreviaturas e siglas

α – alfa

α -Tal – talassemia alfa

β – beta

μ L – microlitros

μ M – micromolar

$^{\circ}$ C – Graus Celsius

x g – força gravitacional

~ – aproximadamente

Δ – delta

A – Adenina

ACA – Artéria Carótida Anterior

ACI – Artéria Carótida Interna

ACM – Artéria Cerebral Média

ADCY9 – adenilato ciclase 9

AIT – Ataque isquêmico transitório

ANXA2 – anexina A2

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BH - Belo Horizonte

C - Citosina

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAR - *Central African Republic* - República Central Africana

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

cm/s – centímetros por segundo

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

DCV - Doença cerebrovascular

DNA - *Desoxirribonucleic acid* - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - *deoxynucleotide triphosphate* - desorribonucleotídeo trifosfatado

DP – Desvio padrão

DRS - Diretoria regional de saúde

DTC – Doppler transcraniano cerebral

EDTA - *EthyleneDiamineTetrAcetic acid* - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ENPP1 – ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 1

EUA - Estados Unidos da América

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais

fL – fentolitros

FS - Padrão eletroforético com hemoglobinas fetal e S

FSA - Padrão eletroforético com hemoglobinas fetal, S e A

FSC - Padrão eletroforético com hemoglobinas fetal, S e C

FV – Fator V de Leiden

G – Guanina

g – gramas

gDNA – DNA genômico

g/dL – gramas por decilitro

GOLGB1 – golgina B1

G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase

Haplótipos β^S - Haplótipos do agrupamento de genes da β^S -globina

Hb - Hemoglobina

Hb A – Hemoglobina A

Hb A₂ - Hemoglobina A₂

Hb C - Hemoglobina C

Hb D - Hemoglobina D

Hb F - Hemoglobina Fetal

Hb S - Hemoglobina S

Hb SS – Genótipo homocigoto para hemoglobina S

HBA – Gene da globina alfa

HBB – Gene da globina beta

HBH - Hemocentro de Belo Horizonte

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

Hemominas - Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais

HPFH – *Hereditary persistence of fetal hemoglobin* – Persistência hereditária de hemoglobina fetal

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* – Cromatografia Líquida de Alta Resolução

HU - Hidroxiureia
ICAM-1 – molécula de adesão intercelular-1
IC - Intervalo de confiança
IEF - *Isoelectric focusing* - Eletroforese por Focalização Isoelétrica
IL-4R – receptor de interleucina 4
IL-10 – interleucina 10
IVS - *intervening sequence* – íntron
kb – kilobase
LDH - *Lactate dehydrogenase* - desidrogenase láctica
LEU - leucometria total
MCH – *mean corpuscular hemoglobin*
MCV – *mean corpuscular volume*
MG - Minas Gerais
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
Min – minuto
mL – mililitros
mM – milimolar
MRA – *magnetic resonance angiography* – angioressonância magnética
MRI – *magnetic resonance imaging* – ressonância magnética de imagem
MTHFR – Metilenotetrahidrofolato Redutase
n - número de amostras
NaAc – Acetato de sódio
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
ng – nanogramas
nm – nanômetros
NUPAD - Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da UFMG
ON – *Nitric Oxide* - Óxido nítrico
pb – pares de bases
PCR – *Polymerase Chain Reaction* - Reação em cadeia da polimerase
pmol - *picomols*
PTN - Programa Estadual de Triagem Neonatal
pg – picogramas
PLAQ – Plaquetometria

PON1 – paraoxonase 1

PT – Protrombina

Retic – Contagem de reticulócitos

RFLP - *restriction fragment length polymorphism* - polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição

S β -talassemia - Genótipo heterozigoto composto para hemoglobina S e β -talassemia

S β^+ -talassemia - Genótipo heterozigoto composto para hemoglobina S e β^+ -talassemia

S β^0 - talassemia - Genótipo heterozigoto composto para hemoglobina S e S β^0 - talassemia

SC – Genótipo heterozigoto composto para hemoglobinas S e C

SD – Genótipo heterozigoto composto para hemoglobinas S e D

SDS – *Sodium Dodecylsulphate* – Dodecil Sulfato de Sódio

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de nucleotídeo única

SpO₂ – Saturimetria de oxigênio periférica

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

SS – Genótipo homozigoto para hemoglobina S

STA – Síndrome Torácica Aguda

STOP – *Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia*

SUS – Sistema Único de Saúde

T – Timina

TAE – *Tris-acetate-EDTA*

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TEK – tirosina quinase

TGFBR3 – receptor do fator de transformação do crescimento beta III

TNF- α – fator necrose tumoral alfa

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

U – Unidade

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VCAM-1 – Molécula de adesão celular-vascular-1

VCM - Volume corpuscular médio

VMM - Velocidade média máxima

vs – *versus*

WBC – *White blood cell*

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Condições das reações de genotipagem das variáveis genéticas estudadas e a forma de interpretação dos resultados

Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos sintéticos para cada tipo de deleção da α -Tal, respectivas concentrações utilizadas nas reações de PCR e tamanho esperado dos produtos da amplificação

Lista de Quadros

Quadro 1 – Patologia da doença falciforme

Quadro 2 – Características laboratoriais da doença falciforme

Quadro 3 – Estudos publicados na literatura científica que avaliaram fatores de risco para doença cerebrovascular em indivíduos com doença falciforme

Lista de Figuras

Figura 1 – Distribuição global do alelo β^S e da malária

Figura 2 - Incidência da anemia falciforme (*) no estado de Minas Gerais em nascidos vivos, por Diretorias Regionais de Saúde

Figura 3 – Fisiopatologia da vaso-oclusão

Figura 4 – Idade quando do primeiro evento de doença cerebrovascular por genótipo; (–) SS; (...) SC; (---) $S\beta^+$ -tal; (- -) $S\beta^0$ -tal

Figura 5 – Risco de AVC isquêmico e hemorrágico em pacientes Hb SS por idade

Figura 6 – Lesão e cura de artéria cerebral na doença falciforme.

Figura 7 – Vasculopatia e AVC na doença falciforme

Figura 8 – Fluxograma da seleção da casuística estudada

Figura 9 – Fluxo de diagnóstico molecular de HPFH

Figura 10 - Ilustração do gene da globina beta (*HBB*), mostrando as regiões sequenciadas para identificação das mutações causadoras de talassemia beta heterozigótica associada à Hb S

Figura 11 – Genotipagem do alelo β^S (*HBB*:c.20A>T, p.E6V)

Figura 12 - Ilustração do agrupamento de genes da globina alfa, extensão das deleções e posição dos oligonucleotídeos

Figura 13 – Genotipagem do polimorfismo *ADCY9* (rs2238432)

Figura 14 – Genotipagem do polimorfismo *ANXA2* (rs11853426)

Figura 15 – Genotipagem do polimorfismo *ENPP1* (rs1044498)

Figura 16 – Genotipagem da variante *GOLGB1* Y1212C (rs3732410)

Figura 17 – Genotipagem da variante *IL-4R* S503P (rs1805015)

Figura 18 – Genotipagem do SNP *IL-10* G-1082A (rs1800896)

Figura 19 – Genotipagem do SNP *IL-10* C-819T (rs1800871)

Figura 20 – Genotipagem do SNP *IL-10* C-592A (rs1800872)

Figura 21 – Genotipagem da mutação *PON1* Q192R (rs662)

Figura 22 – Genotipagem do SNP em *TEK* (rs489347)

Figura 23 – Genotipagem do SNP *TGFFR3* (rs284875)

Figura 24 – Genotipagem do SNP *TNF- α* -308G>A (rs1800629)

Figura 25 – Genotipagem do SNP *VCAM-1* c.1238G>C (rs3783613)

Figura 26 – Genotipagem de deleções que causam Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (HPFH)

Figura 27– Genotipagem da variante *G6PD* A376G (rs1050829)

Figura 28 – Genotipagem da variante *G6PD* G202A (rs1050828)

Figura 29 – Genotipagem da variante *G6PD* A⁻ T968C (rs76723693)

Figura 30 – Genotipagem da variante *G6PD* A⁻ G680T (rs137852328)

Figura 31 – Genotipagem da variante *G6PD* A⁻ A542T (rs5030872)

Figura 32 – Genotipagem da variante *G6PD* C563T (rs5030868)

Figura 33 – Genotipagem da variante *G6PD* G844C (rs137852318)

1. Apresentação

Esta tese representa o produto final de um projeto de pesquisa desenvolvido pelo programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e com a parceria da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (Hemominas). Baseando-se na resolução 03 de 05 de fevereiro de 2010 que regulamenta o formato de teses e dissertações no âmbito do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente, serão apresentadas uma introdução e as justificativas da execução do trabalho, seguida de uma revisão de literatura ampla sobre o tema abordado. A seção seguinte descreverá os objetivos e a metodologia utilizada no desenvolvimento do estudo. Posteriormente, serão apresentados artigos científicos que contêm os resultados obtidos no trabalho. Finalizando, uma conclusão breve, resumizando os principais achados do estudo.

2. Introdução e Justificativa

A anemia falciforme (MIM#603903) (1), uma hemoglobinopatia hereditária pertencente ao grupo das doenças falciformes, é causada por uma única mutação de ponto no gene da globina beta (*HBB*- MIM#141900, locus 11p15.4) e produz uma diversidade de expressões fenotípicas nos pacientes acometidos (2). Dentre elas, as complicações cerebrais são extremamente graves (3).

Eventos neurológicos em pacientes com doença falciforme foram relatados poucos anos depois da primeira descrição da doença. Em 1924, o caso de uma criança com doença falciforme, convulsões e hemiparesia aguda foi publicado (4). Vários

outros casos envolvendo o sistema nervoso de indivíduos com doença falciforme foram relatados posteriormente e não demorou muito até que a doença cerebrovascular fosse reconhecida como uma manifestação clínica importante da doença (5).

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é complicação grave da doença falciforme, podendo causar sequelas cognitivas e físicas permanentes (6). Apesar da história natural do AVC associado à doença falciforme estar bem descrita (7, 8), a fisiopatologia do evento ainda não é totalmente entendida (6). Com exceção da velocidade aumentada do fluxo sanguíneo cerebral detectado pelo Doppler Transcraniano Cerebral (DTC) (9), poucos fatores de risco são conhecidos.

Apesar de o DTC ser reconhecido como preditor sensível do risco de AVC, essa técnica de rastreamento é relativamente pouco específica e seu valor preditivo positivo é baixo. Cerca de 60% dos indivíduos de alto risco de AVC detectado pelo DTC não terão o evento e seriam submetidos, pela conduta atualmente vigente, ao regime de transfusão crônica e expostos, de forma desnecessária, aos efeitos adversos dessa terapêutica (10, 11). Não há métodos para predição de qual criança com DTC de alto risco não terá AVC e, então, não seria beneficiada pelo regime de transfusões crônicas. Pesquisas para identificar quais crianças irão desenvolver o AVC após o teste de DTC anormal são necessárias (12). Em estudo realizado na Nigéria, nenhuma das 17 crianças que tiveram DTC de alto risco e permaneceram sem tratamento, por opção dos pais ou responsáveis, desenvolveram AVC após acompanhamento médio de $27,3 \pm 11,1$ meses (13). Somente cerca de 10% dos indivíduos com o DTC de alto risco sofrerão AVC um ano após a realização do exame (14). Além disso, estima-se que, para evitar a ocorrência de um episódio de AVC, seria necessário colocar sete crianças em regime de transfusão crônica (15). Falhas na recomendação do regime de transfusão crônica para prevenção primária do AVC baseado no exame do DTC aconteceram e permanecem acontecendo (16).

Por outro lado, o AVC ainda ocorre em cerca de 19% das crianças com DTC normal (10, 14) e há uma variabilidade intra-individual relativamente grande (17). Além disso, o acesso ao DTC e à terapia transfusional crônica são limitados (18, 19), especialmente em países em desenvolvimento (19, 20). Existe resistência quando o risco *vs* benefício em relação à terapia transfusional por parte de hematologistas e, principalmente, dos pais ou responsáveis. Os motivos para rejeição do regime de

transfusões crônicas são diversos e incluem, principalmente, o alto custo do tratamento, indisponibilidade de sangue e a duração indeterminada do programa (13).

A terapia transfusional traz riscos para os pacientes como reações transfusionais, infecções (21), aloimunização e sobrecarga de ferro. Dos efeitos adversos do regime de transfusão crônica, destaca-se a alta prevalência de aloimunização. Recentemente, um estudo realizado na Filadélfia mostrou que 57,7% dos pacientes com doença falciforme em regime de transfusão crônica tornam-se aloimunizados apesar da utilização de compatibilização estendida (22). O risco de sobrecarga e o valor exorbitante do tratamento da quelação do ferro também merecem destaque quando se avalia as desvantagens do regime de transfusão crônica (23). Há poucos dados sobre a sobrecarga de ferro em crianças com doença falciforme, assim como do efeito na mortalidade do uso em longo prazo do regime de transfusões crônicas (12).

A identificação antecipada de crianças com alto risco de desenvolver AVC permitiria a realização de intervenções, tais como, regime de transfusão crônica, transplante de medula óssea e a terapia com hidroxiureia (HU), antes do desenvolvimento de possíveis sequelas motoras e neurocognitivas. Além disso, predição de risco mais apurada poderia evitar a indicação de terapias potencialmente tóxicas e arriscadas em pacientes com risco reduzido.

Além das dificuldades citadas anteriormente, os programas de rastreamento pelo DTC apresentam, em todo o mundo, problemas de adesão ao procedimento (18, 20, 24-26). Pesquisa realizada nos Estados Unidos da América (EUA) mostrou que apenas 42% das crianças com anemia falciforme e $S\beta^0$ -talassemia ($S\beta^0$ -tal) entre 2 a 12 anos de idade foram rastreadas pelo DTC no ano anterior ao estudo (24). Estudo similar realizado no Reino Unido mostrou que menos da metade das crianças possuem acesso ao DTC (18). Em um estudo retrospectivo realizado em um grande centro pediátrico americano, a média da taxa anual de DTC foi de 45% (26). Mais recentemente, estudo realizado com crianças do Tennessee (EUA) mostrou que, apesar da adesão ao protocolo de rastreamento ter aumentado consideravelmente, cerca de um terço das crianças não havia realizado nenhum teste de DTC durante o período de estudo (1997 a 2008) (25).

A dificuldade na realização do exame está ligada, principalmente, ao não comparecimento aos exames agendados. Há pouca disponibilidade de técnicos treinados

na realização dos exames e os disponíveis seriam de baixa qualificação. Também existem poucos profissionais que sabem interpretar adequadamente os resultados (24). Além disso, muitos serviços não possuem o programa de rastreamento pelo DTC implementado.

Por causa da heterogeneidade clínica da doença falciforme, há grande interesse em prever quais pacientes seriam mais gravemente afetados. Entretanto, atualmente, os pediatras hematologistas permanecem incapazes de prever quais crianças terão doença clinicamente mais grave durante a infância (27). Se os pacientes sob alto risco puderem ser identificados, intervenções preventivas poderiam ser realizadas para evitar a ocorrência e consequências das manifestações clínicas graves (28).

Biomarcadores podem ter papel importante no acompanhamento de pacientes com doença falciforme, incluindo diagnóstico precoce de complicações, detecção de dano crônico a órgãos, monitoramento de resposta a tratamento e identificação de indivíduos sob risco de manifestações clínicas graves. Entretanto, atualmente não há marcadores validados em crianças que possam ser utilizados para prever manifestações graves da doença (29).

Vários estudos de associação genética têm sido feitos para tentar associar polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism* – SNP) com complicações da doença falciforme. Entretanto, a maioria das associações genéticas é ainda preliminar e são necessários estudos de confirmação (2). Apesar de vários estudos previamente publicados terem associado SNPs com o risco de AVC em indivíduos com doença falciforme, poucos foram validados, principalmente porque a interpretação desses estudos fica prejudicada pela amostra relativamente pequena e/ou ausência de coortes de pacientes para a validação dos resultados (30).

Como o AVC em indivíduos com doença falciforme é complicação multifatorial, a análise do efeito combinado de múltiplas variáveis pode resultar em maior sucesso na identificação de indivíduos com alto risco de AVC. Seria possível, dessa forma, reduzir a incidência, a morbidade e a mortalidade do evento, e consequentemente, melhorar a qualidade e aumentar a expectativa de vida das crianças acometidas pela doença.

Além disso, poder-se-ia evitar o aumento considerável de custo para o Sistema Único de Saúde (SUS), gerado no tratamento e acompanhamento ambulatorial dos

indivíduos acometidos pelo AVC. O custo do programa de transfusão com quelação tem sido estimado em 40.000 dólares/ano com deferoxamina (31) e 45.000 euros/ano com deferasirox (32). Mais ainda, um episódio de AVC requer custos adicionais de reabilitação de 40.000 dólares/ano, além do programa transfusional com quelação por toda a vida (33).

Dessa forma, o estudo de marcadores de prognóstico pode complementar o teste do DTC, fornecendo maior segurança com relação à indicação de terapias preventivas, bem como na avaliação da desnecessidade das mesmas.

3. Revisão de Literatura

3.1 Doença falciforme: definição, incidência e prevalência

A doença falciforme constitui um conjunto de desordens genéticas autossômicas recessivas, caracterizadas pela presença de, pelo menos, um alelo mutante β^S do gene *HBB* que codifica a cadeia beta globina da hemoglobina (Hb) (2, 34). Os genótipos de doença falciforme mais comuns em Minas Gerais são Hb SS, Hb SC, Hb S β^+ -tal e Hb S β^0 -tal (35). Nesse grupo destaca-se a anemia falciforme, geneticamente determinada pela homozigose do alelo mutante β^S (Hb SS). Esse genótipo apresenta maior gravidade clínica e hematológica, e maior morbidade e mortalidade (34, 36).

A distribuição global do alelo β^S é consequência de dois fatores: 1) pressão seletiva exercida em regiões que no passado, ou ainda atualmente, são endêmicas para malária; e 2) migração (Figura 1) (2). Em 2007, o Ministério da Saúde estimou a prevalência de 25.000 a 30.000 indivíduos com anemia falciforme no País e a incidência de 3.500 novos casos a cada ano (37). No Estado de Minas Gerais, estima-se a incidência de uma criança com doença falciforme a cada 1.400 nascidos vivos e uma com anemia falciforme (somente a forma Hb SS) a cada 2.500 nascidos vivos (35).

Portanto, a doença falciforme é problema de saúde pública de impacto significativo em Minas Gerais e no Brasil.

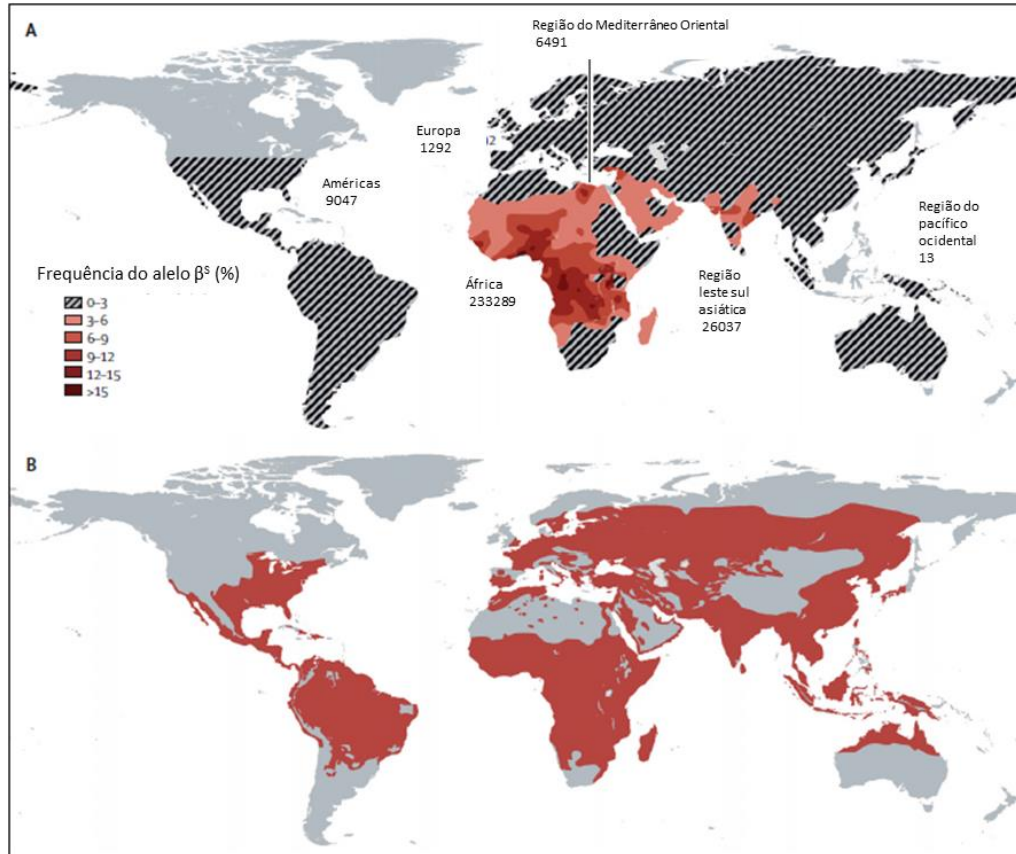


Figura 1 – Distribuição global do alelo β^S e da malária

- (A) Este mapa mostra a distribuição do alelo β^S . As figuras indicam as estimativas anuais do número total de indivíduos afetados pelos genótipos Hb SS, Hb SC ou Hb S/ β -talassemia, por regiões da Organização Mundial de Saúde.
- (B) Este mapa mostra a distribuição global de malária (vermelho) antes de intervenções para controle da infecção.

Fonte: modificado de (2)

A figura 2 ilustra a incidência da anemia falciforme em nascidos vivos no estado de Minas Gerais, de acordo com as diretorias regionais de saúde (DRS). Até março de 2012, 5.813 pacientes com doença falciforme estavam cadastrados na Fundação Hemominas para acompanhamento clínico, sendo que 3.319 possuíam o genótipo homocigoto Hb SS (38).

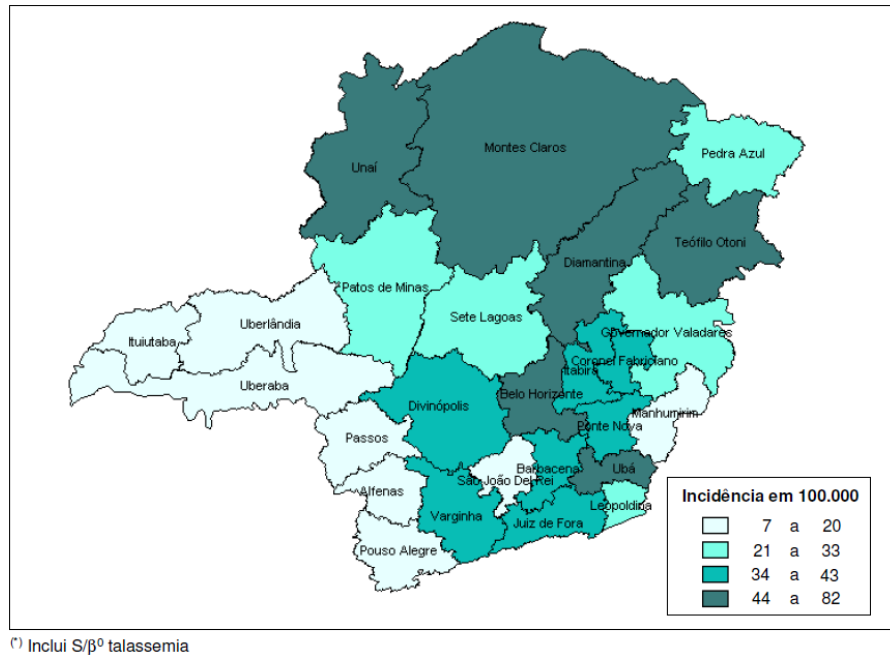


Figura 2 - Incidência da anemia falciforme (*) no estado de Minas Gerais em nascidos vivos, por Diretorias Regionais de Saúde.
Fonte: (35)

3.2 Fisiopatologia da Doença Falciforme

A Hemoglobina S (Hb S) é gerada quando ocorre uma mutação de ponto no sexto códon do gene da globina beta (*HBB*:c.20A>T, p.E6V), levando a substituição de um aminoácido normal hidrofílico (ácido glutâmico) por um aminoácido hidrofóbico (valina) na superfície da cadeia beta da globina variante (β^S globina). Como o resíduo de valina interage com sítios complementares adjacentes das cadeias de globina, a proteína resultante é propensa à polimerização (36, 39).

Em determinadas situações como hipóxia, desidratação e acidose, as moléculas de Hb S formam polímeros alongados que modificam o citoesqueleto das hemácias, dando origem à forma característica de foice (falcização). A polimerização da Hb S causa diversas modificações físico-químicas nas hemácias e é o evento primário, indispensável para a patogênese da doença falciforme (36, 40). A taxa e a extensão da polimerização das Hb S é proporcional à extensão e à duração da desoxigenação da Hb, à concentração de Hb S e hemoglobina fetal (Hb F) na hemácia (2).

Quando uma concentração crítica de polímero de Hb S acumula na hemácia, ocorre lesão celular e, conseqüentemente, as manifestações fenotípicas da doença falciforme, caracterizada por anemia hemolítica crônica grave e vaso-oclusão (41). A lesão celular inclui dano à membrana e aumento da sua rigidez, além de desidratação e aumento da expressão de moléculas de adesão (29).

As hemácias falcizadas tornam-se mais aderentes e ligam-se umas às outras, a hemácias não-falcizadas, a células nucleadas, plaquetas e ao endotélio vascular causando a vaso-oclusão (Figura 3). A aderência de células falcizadas ao endotélio pode diminuir o fluxo sanguíneo, o suficiente para que o processo sucessivo de polimerização de Hb S, falcização e vaso-oclusão ocorra antes que a passagem de sangue através da microvasculatura se complete (36, 40). A obstrução microvascular causa isquemia tecidual, resultando em uma cascata de eventos patológicos, incluindo hemólise, disfunção endotelial, inflamação, hipercoagulabilidade, estresse oxidativo, reperfusão, hipóxia, infarto e lesão por esquia-reperfusão em vários órgãos e tecidos (2, 39).

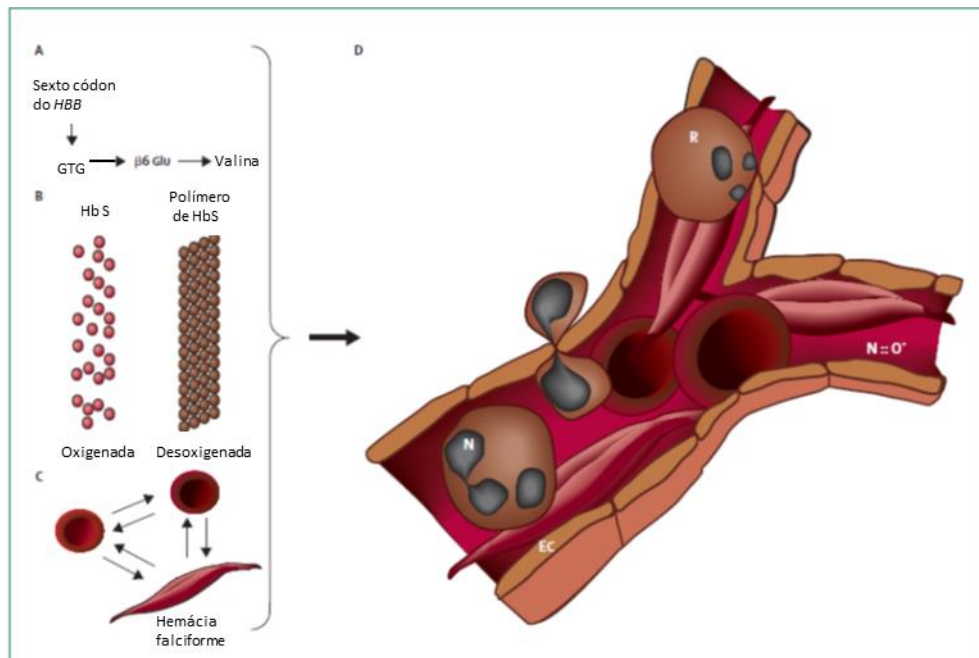


Figura 3 – Fisiopatologia da vaso-oclusão. (A) Substituição de uma única base. (B) Polimerização das Hb S. (C) Mudança no formato da hemácia. (D) Corte transversal de bifurcação microvascular. R= reticulócito. N = leucócito. EC = endotélio. N::O = biodisponibilidade de óxido nítrico. A obstrução de do lúmen inicia-se pela ligação de reticulócitos pró-adesivos ao endotélio com ligações secundárias de hemácias falciformes

irreversíveis. Os leucócitos participam da formação de agregados heterocelulares e a biodisponibilidade de óxido nítrico, crucial para vasodilatação, é prejudicada.

Fonte: modificado de (36)

A hemácia falciforme, com conteúdo e membrana anormais, interage com endotélio vascular. Essa interação danifica e estimula tanto o endotélio, como as células circundantes. A rigidez, a adesividade e o estresse oxidativo das hemácias falciformes são estimulantes e provocam resposta inflamatória. Os tecidos não são apenas subperfundidos, mas também expostos a citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e a ações das células ativadas que produzem e respondem a essas moléculas (42).

A falcização também leva à anemia hemolítica crônica. A hemólise crônica das hemácias causa um quadro de anemia persistente por que a sobrevida encurtada das hemácias não é contrabalançada de forma plena pela eritropoiese aumentada. A polimerização expõe antígenos de membrana, o que aumenta a destruição das hemácias circulantes. A sobrevida média das hemácias passa a ser de 17 dias, em contraste com os 120 habituais (43).

Além disso, o grau de hemólise afeta a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), um regulador do tônus vascular. A hemoglobina livre consome o NO e afeta a sua função vascular homeostática. As hemácias lisadas também liberam arginase, que destrói a L-arginina, substrato para produção de NO. A hemoglobina, o grupo heme e o ferro livres catalisam a produção de radicais livres de oxigênio, potenciais consumidores de NO e ativadores do endotélio (44) A diminuição da biodisponibilidade de NO e a formação de radicais livres levam à disfunção endotelial e contribuem para um estado de hipercoagulabilidade.

Portanto, os fenômenos vaso-oclusivos e a hemólise crônica, acompanhados dos processos inflamatórios deles decorrentes, são os principais determinantes das manifestações clínicas da doença falciforme (2).

3.3 Manifestações Clínicas da Doença Falciforme

Apesar de ser moléstia fundamentalmente do sangue, a doença falciforme afeta o corpo inteiro (Quadro 1) e as manifestações clínicas começam muito cedo na infância (39). Os sintomas da doença falciforme têm início quando a síntese de cadeias da gama globina é substituída pela síntese de cadeias beta, aumentando progressivamente a concentração relativa de Hb S. Níveis patológicos de Hb S podem ser alcançados após a oitava semana de vida em alguns indivíduos. Complicações potencialmente fatais podem acontecer a partir dessa idade (34).

Quadro 1 – Patologia da doença falciforme

Características patológicas da doença falciforme	
Cardíaco	Aumento do débito cardíaco Cardiomegalia Cardiomiopatia Hipertrofia ventricular esquerda Infarto agudo do miocárdio Arritmia Insuficiência cardíaca congestiva
Pulmonar	Infecção Embolia gordurosa ou de medula óssea Edema pulmonar Doença falciforme pulmonar Hipertensão pulmonar
Hepatobiliar	Hepatomegalia Sequestro hepático Coletasse intra-hepática Colelitíase Sobrecarga de ferro Hepatites virais
Esplênico	Sequestro esplênico Esplenomegalia, hipoesplenia, asplenia Infarto esplênico
Renal	Falência renal aguda e crônica Pielonefrite Carcinoma renal medular
Musculoesquelético	Infarto

Necrose
Mudanças degenerativas
Osteomielite
Artrite séptica
Osteonecrose
Osteopenia/Osteoporose

Neurológico

Aneurisma
AVC isquêmico
Ataque isquêmico transitório
AVC hemorrágico
Infarto silencioso
Déficit cognitivo

Oftalmológico

Isquemia da retina periférica
Retinopatia proliferativa
Hemorragia vítrea
Descolamento da retina
Alterações não proliferativas da retina

Endocrinológico

Hipogonadismo primário
Hipopituitarismo
Insuficiência hipotalâmica

Todos os sistemas e órgãos

Atraso no crescimento e desenvolvimento

Fonte: modificado de (43)

O período de proteção propiciado pelo nível relativamente alto de Hb F permite, após o diagnóstico pela triagem neonatal, realização de intervenções precoces, como o uso de penicilina profilática e imunizações (39). Essas medidas têm diminuído significativamente a mortalidade em crianças com anemia falciforme (45).

As manifestações clínicas mais comuns em crianças são as crises álgicas, a síndrome torácica aguda (STA), a anemia aguda (sequestro esplênico agudo e anemia aplástica aguda), infecções e o AVC (27). O sequestro esplênico e a dactalite podem ocorrer no primeiro ano de vida, mas a maioria das outras complicações tende a ocorrer após um ano de vida (39).

A doença falciforme cursa de forma crônica, pontuada por eventos agudos que diminuem a expectativa de vida dos pacientes acometidos (40). Após período de anos ou décadas, a isquemia e a hemólise crônica promovem lesões progressivas em órgãos

como o pulmão, o coração, o cérebro, o rim, os ossos, dentre outros. A lesão pode não se manifestar até a vida adulta, tendo curso clínico aparentemente benigno durante a infância. A lesão a órgãos pode ser aguda ou crônica, sintomática ou silenciosa, episódica ou progressiva (28). Hipertensão pulmonar, osteonecrose, insuficiência renal crônica e disfunções cognitivas são exemplos de complicações crônicas graves da doença falciforme.

3.4 Características Laboratoriais da Doença Falciforme

A maioria dos pacientes com doença falciforme apresenta anemia persistente. Entretanto, a anemia nem sempre é sintomática, pois o organismo compensa a destruição precoce das hemácias, acelerando a eritropoiese na medula óssea. Assim sendo, percursoros imaturos de hemácias são liberados da medula óssea prematuramente. Outra consequência das altas taxas de hemólise e eritropoiese é a acumulação de bilirrubina indireta ou não conjugada.

O quadro 2 lista os achados laboratoriais mais comuns em pacientes com doença falciforme (46). A concentração total de Hb F varia significativamente entre os pacientes com doença falciforme, assim como a sua distribuição nas hemácias (47).

Quadro 2 – Características laboratoriais da doença falciforme

Achados laboratoriais mais comuns	
Característica laboratorial	Etiologia
Hemoglobina e hematócrito diminuídos	Hemólise
VCM elevado	Aumento da contagem de reticulócitos
Contagem global de leucócitos elevado	Inflamação e aumento da eritropoiese
Contagem de plaquetas elevada	Aumento da eritropoiese
Desidrogenase láctica elevada	Hemólise
Hepatoglobina elevada	Hemólise
Fosfatase alcalina sérica elevada nas crises	Aumento da eritropoiese
Fragilidade osmótica diminuída	Desidratação celular
Fragilidade térmica e mecânica aumentada	Alterações da membrana eritrocitária
Hematúria frequente	Necrose das papilas renais
Ácido úrico sérico pode estar elevado	Aumento do metabolismo do DNA
Urobilinogênio urinário elevado	Aumento de bilirrubina

3.5 Gravidade clínica

Além do amplo espectro de manifestações clínicas, o curso clínico da doença apresenta variação substancial entre os indivíduos afetados (2). Dessa forma, fatores ambientais e genéticos têm sido usados para explicar essa diversidade fenotípica (49).

Fatores ambientais como o local onde vive o paciente, prevalência de doenças infectocontagiosas, condições socioeconômicas e acesso e qualidade da assistência médica podem influenciar no fenótipo da doença (50). Entretanto, os fatores ambientais são pouco caracterizados, mas podem ser responsáveis por grande parte da variabilidade fenotípica da doença falciforme. A maior gravidade da doença falciforme em pacientes africanos é um forte indicativo a favor dessa hipótese (2).

Apesar de originar-se a partir da substituição de um único nucleotídeo, o fenótipo da doença falciforme é o produto de muitos genes (49). Os dois maiores modificadores genéticos estabelecidos na literatura são os determinantes da concentração e distribuição de Hb F e a coexistência de talassemia alfa (α -Tal) (2, 47). Ambos os fatores diminuem a polimerização, evento molecular fundamental na fisiopatologia da doença.

As manifestações clínicas dos pacientes acometidos pela doença falciforme são influenciadas por três tipos de genes: 1) o gene *HBB*, que abriga a mutação primária, ou seja, o alelo β^S ; 2) genes pleiotrópicos, que estão envolvidos na fisiopatologia secundária, sendo indispensável à presença da primeira mutação, cada um com o potencial de modificar a extensão e a característica das manifestações clínicas do paciente (ex: hemólise, hiperplasia eritróide na medula óssea, necrose óssea e outros); e 3) genes epistáticos, que modulam significativamente a fisiopatologia da doença em um paciente em particular. Esses eventos secundários contribuem de forma significativa para o fenótipo e explicam parcialmente as diferenças interindividuais marcantes na gravidade da doença (51).

3.6 A Doença Cerebrovascular na Doença Falciforme

3.6.1 Definições

A doença cerebrovascular na doença falciforme é um termo amplo que inclui eventos que afetam o cérebro de várias maneiras, tanto estruturalmente como funcionalmente (39). Não existe padronização para o termo doença cerebrovascular na literatura e definições diferentes têm sido utilizadas (32, 52-57). As definições dos principais eventos usualmente considerados na literatura como doença cerebrovascular são listadas abaixo:

AVC isquêmico: evento neurológico agudo com duração de mais de 24 horas, secundário à oclusão de uma artéria, resultando em isquemia e déficit neurológico (52).

Ataque isquêmico transitório: sinais neurológicos com distribuição vascular, no qual os sintomas se resolvem dentro de 24 horas (ou 48 horas, se o sistema basilar estiver envolvido) (52).

Infarto silencioso: evidência de infarto cerebral na ressonância magnética de imagem (MRI) em paciente sem história compatível de evento cerebrovascular (58).

Doppler transcraniano de alto risco: velocidade média máxima (VMM) maior ou igual a 200 cm/s na artéria cerebral média (ACM) ou na artéria carótida interna (ACI), detectada pelo DTC (9).

Angioressonância Magnética (MRA) alterada: estenose ou oclusão aparente de qualquer vaso ou tortuosidade arterial (59).

AVC hemorrágico: evento neurológico agudo com duração de mais de 24 horas, secundário a hemorragia de uma artéria, resultando em isquemia e déficit neurológico (52).

3.6.2 Incidência e prevalência

A doença cerebrovascular é uma das complicações mais graves da doença falciforme e afeta quase metade das crianças até os 14 anos (32). A prevalência global de doença cerebrovascular estimada pelo “*Cooperative Study of Sickle Cell Disease*” para todos os pacientes foi de 3,75% (52). Entretanto, a frequência do evento depende do genótipo da doença, da idade e da população estudada. A maior incidência ocorre em homocigotos Hb SS (0,61 por 100 pacientes-ano), seguido dos indivíduos Hb SC (0,15 por 100 pacientes-ano), Hb S β^+ -tal (0,09 por 100 pacientes-ano) e Hb S β^0 -tal (0,08 por 100 pacientes-ano) (Figura 4) (52).

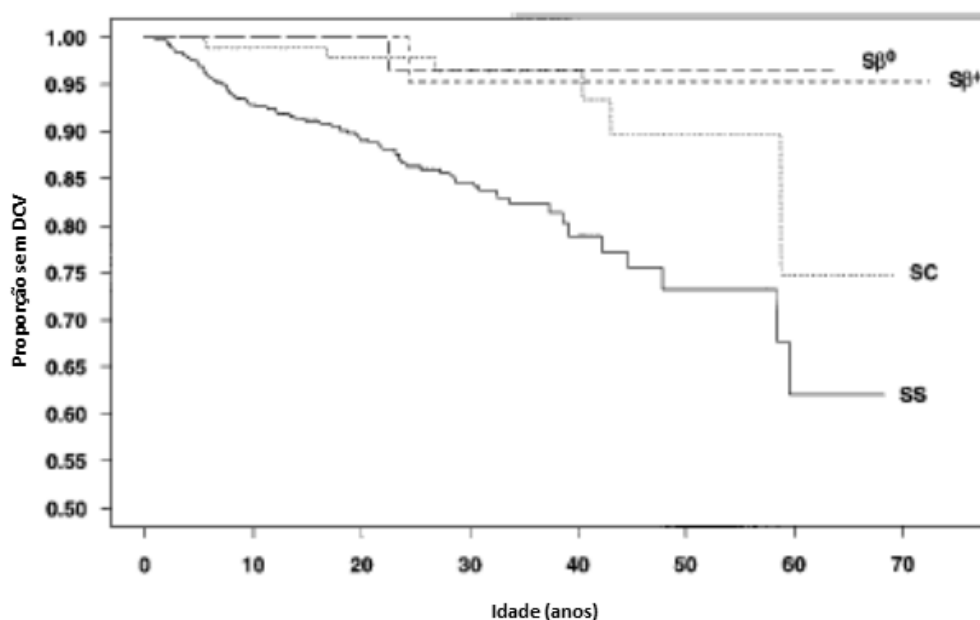


Figura 4 – Idade quando do primeiro evento de doença cerebrovascular por genótipo da doença falciforme; (—) SS; (...) SC; (---) S β^+ -tal; (- -) S β^0 -tal.

Fonte: modificado de (52)

Crianças com anemia falciforme possuem o risco 300 vezes maior de apresentarem AVC quando comparadas com crianças sem a doença, fazendo da anemia falciforme a causa mais comum de ocorrência de AVC na infância (52, 60). Sem medidas preventivas, 11% de pacientes apresentarão AVC sintomático até 20 anos de idade e 24% até 45 anos (52). O pico de incidência do primeiro AVC isquêmico ocorre na primeira fase da infância, entre dois e cinco anos de idade (1,02 por 100 pacientes-ano), havendo diminuição da incidência em pacientes de seis a nove anos (0,79 por 100

pacientes/ano). A menor incidência ocorre entre os 20 a 29 anos, período de maior incidência de AVC hemorrágico. Um novo pico de incidência de AVC isquêmico ocorre após os 29 anos (Figura 5).

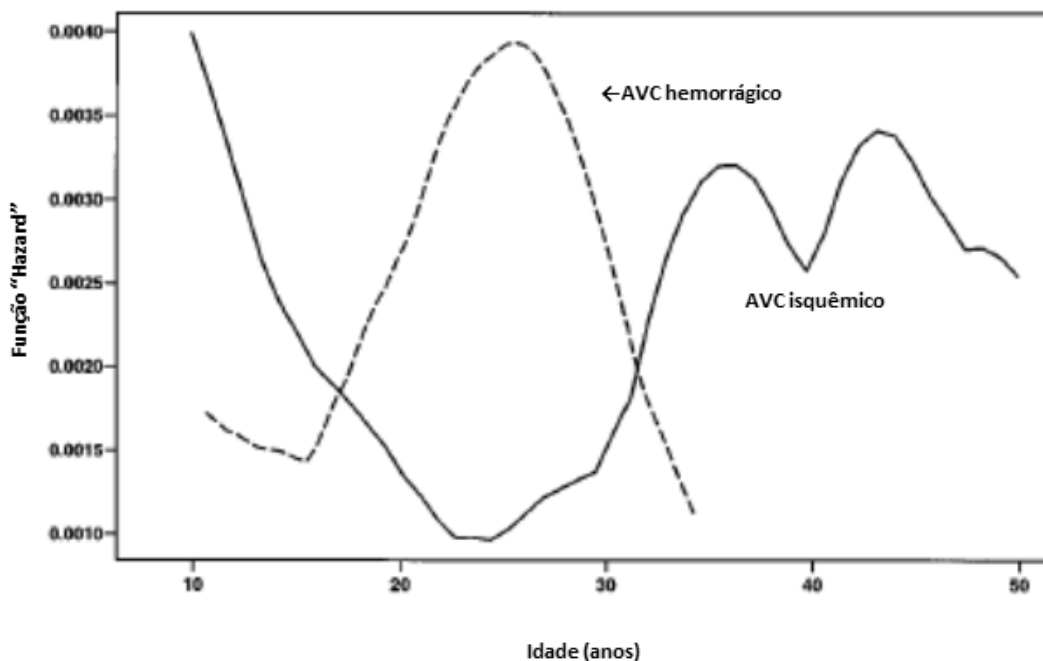


Figura 5 – Risco de AVC isquêmico e hemorrágico em pacientes Hb SS por idade. Linha contínua: AVC isquêmico; Linha tracejada: AVC hemorrágico.

Fonte: modificado de (52)

Dados do *Dallas Pediatric Sickle Cell Program* mostraram que a taxa global de AVC entre os indivíduos Hb SS e Hb S β^0 -tal (n=448) foi de 0,85 por 100 paciente-ano em indivíduos acompanhados até 18 anos de idade. O mesmo estudo mostrou que as probabilidades estimadas de sobrevida livre do primeiro AVC com 2, 6 e 10 anos são de 99,5 (IC95% 98,8-100), 94,3 (IC95% 91,8-96,8) e 91,6 (IC95% 88,4-94,5) em crianças Hb SS e Hb S β^0 -tal (61).

Pacientes que tiveram AVC isquêmico possuem risco muito elevado de recorrência, principalmente nos primeiros anos após o primeiro evento. Quando a terapia profilática não é realizada após o primeiro AVC isquêmico, o risco de recorrência observado em estudos de coorte variou entre 46% e 67% (8, 62). A

mortalidade por AVC hemorrágico nos primeiros dias após o evento é aproximadamente de 25%. Entretanto, no AVC isquêmico, o óbito é raro (52, 63).

A prevalência de DTC alterado também varia conforme a população estudada. No estudo multicêntrico STOP (*Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Disease*), realizado nos EUA e Canadá, cerca de 9% dos participantes apresentaram exame de alto risco (≥ 200 cm/s), 15% de risco condicional (170 cm/s a 199 cm/s) e 70% baixo risco (<170 cm/s) (64). Em outro estudo realizado no EUA, das 249 crianças estudadas 78,3% apresentaram DTC de baixo risco, 11,7% condicional e 10% alto risco (65). Na França, 14,8% das 237 crianças Hb SS apresentaram DTC de alto risco (66). Em outro estudo realizado na França, incluindo 373 crianças, 16,6% apresentaram DTC de alto risco (67). No Reino Unido, 6,5% das 155 crianças estudadas apresentaram DTC de alto risco e 8,4% DTC condicional (68). Em africanos, dos 601 indivíduos estudados 6,99% apresentaram DTC de alto risco, 4,16% risco condicional e 88,85%, baixo risco (69). Na Nigéria, das 237 crianças submetidas ao DTC, 69,2% apresentaram DTC de baixo risco, 21,9% risco condicional e 8,4%, risco alto (20).

No Hemocentro de Belo Horizonte (HBH) da Fundação Hemominas, foi analisada uma coorte de 262 crianças triadas pelo PTN-MG, com perfil hemoglobínico FS, nascidas entre março de 1998 e dezembro de 2005 e acompanhadas até maio de 2009. As crianças foram classificadas de acordo com o protocolo do estudo STOP (9), sendo de baixo risco 189 crianças (74,7%); 19 risco intermediário baixo (7,6%); 7 risco intermediário alto (2,8%) e 8 risco alto (3,2%); 29 (11,6%) dos exames foram inadequados. Treze crianças (5%) haviam sofrido AVC isquêmico antes da realização do DTC. A prevalência global de AVC isquêmico foi de 5% e a incidência de 0,77 por 100 criança-ano. A probabilidade acumulada de ter AVC até 10 anos de idade foi de 8,3%; a de AVC ou DTC risco alto 15,6% (70).

Em estudo multicêntrico realizado no Brasil, o DTC foi de baixo risco em 681 (88,1%) das crianças, condicional em 54 (7%) e anormal em 31 (4%) crianças. Sete (0,9%) crianças tiveram o DTC inadequado (71).

A prevalência de MRA alterada foi de 10,3% em uma série de 516 pacientes com anemia falciforme americanos (57). Na França, em uma coorte de 132 pacientes submetidos ao exame, a probabilidade cumulativa de apresentar MRA anormal até 14 anos de idade foi de 22,6% (32).

A prevalência de infartos silenciosos em crianças com anemia falciforme varia consideravelmente na literatura. Prevalências de 17% (72), 18,3% (73), 21,8% (74), 27% (58), 35,3% (75), 37% (32), 41,5% (57) já foram relatadas na literatura. O notável aumento de prevalência observado ao longo dos anos se deve a modificações na definição do evento, bem com a melhoria nas técnicas de MRI (76).

3.6.3 Fisiopatologia do AVC Isquêmico

Nenhum mecanismo único explica todos os eventos de AVC em indivíduos com doença falciforme (63). Os dois principais mecanismos responsáveis pelo AVC em indivíduos acometidos pela doença são: 1) arteriopatía oclusiva em que existe proliferação das células musculares lisas e aumento de fibroblastos na camada íntima da parede das artérias e, como consequência, estreitamento segmentar progressivo da porção distal da artéria carótida interna e ramos proximais das principais artérias intracranianas (polígono de Willis); 2) agregação das células falciformes e, conseqüentemente, oclusão do lúmen de pequenos vasos (77).

A principal hipótese de causa de AVC isquêmico em pacientes com doença falciforme seria a viscosidade aumentada das hemácias falciforme causando estase e, conseqüentemente, isquemia (76). Entretanto, essa hipótese explica parcialmente a fisiopatologia do evento. Mecanismos múltiplos estão envolvidos, de acordo com hierarquia e cronologia que não estão bem estabelecidas (78).

Assim sendo, é necessário esclarecer como a fisiopatologia da doença falciforme cria a vasculopatia de grandes artérias que leva ao AVC isquêmico. Entretanto, o esquema proposto por Platt (2005) é uma boa aproximação do que se acredita acontecer nas grandes artérias do cérebro antes do evento (Figura 6) (79). O diagrama mostra os fatores que poderiam iniciar e promover a vasculopatia envolvendo grandes artérias cerebrais na doença falciforme. As setas sólidas representam a progressão e as setas tracejadas representam o efeito presumido da transfusão, que poderia impedir ou reverter o processo, se for iniciada antes da produção de estenoses graves. Em certo ponto do processo, a estenose torna-se detectável por meio da ultrassonografia com DTC ou exame de MRA. A causa da obstrução final é desconhecida (3).

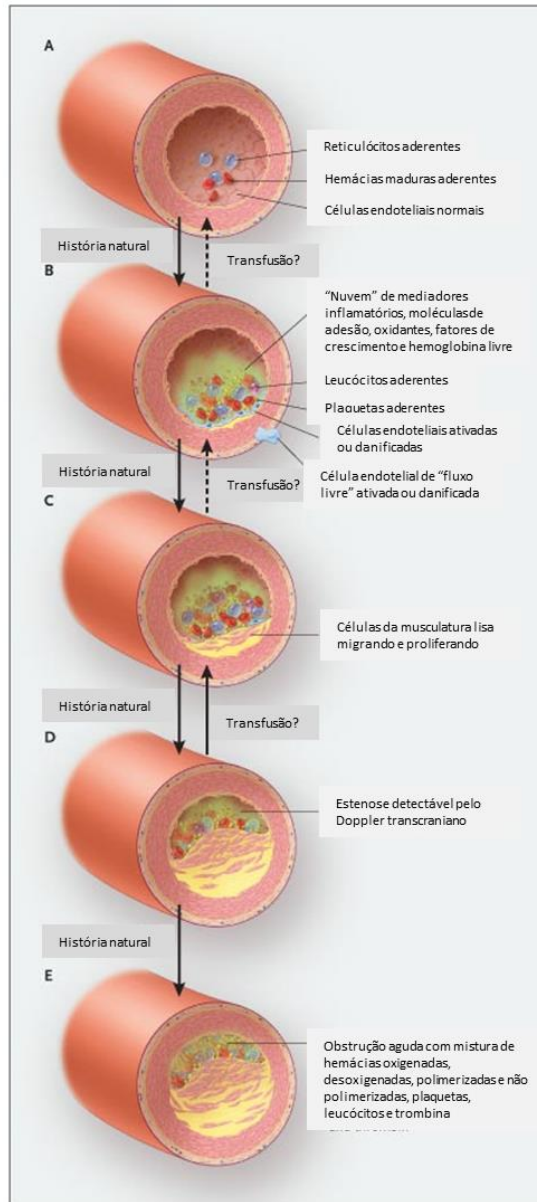


Figura 6 – Lesão e cura de artéria cerebral na doença falciforme. Danos a artérias cerebrais resultam na ligação de reticulócitos e hemácias maduras nas células endoteliais através de ligantes específicos. Essas células são expostas a agentes oxidantes, fazendo com que elas sejam ativadas (Painel A). Células endoteliais ativadas tornam-se cada vez mais aderentes a hemácias, leucócitos e plaquetas. Algumas células endoteliais são desalojadas da matriz subjacente (Painel B). Quanto mais células aderem e são ativadas, uma "nuvem" de mediadores inflamatórios, quimioatrativos, moléculas de adesão, fatores de crescimento, pró-coagulantes e hemoglobina livre são produzidos. Células do músculo liso migram e proliferam, causando uma lesão hiperplásica que invade a lúmen da artéria (Painel C). A lesão, embora assintomática, torna-se detectável à ultrassonografia, utilizando doppler transcraniano (Painel D). Um regime de transfusão crônica, mantendo o nível de Hb S no abaixo de uma determinada concentração (30 a 40%), impede a falcização aguda e o acidente vascular cerebral (Painel E) e promove a reversão do dano. Quando o regime de transfusão é interrompido, a lesão (e o risco de acidente vascular cerebral) retorna.

Fonte: modificado de (79).

Hemácias falciformes aderem em grau mais acentuado ao endotélio vascular por meio de várias pontes hemácia-endotélio, algumas necessitando de uma proteína intermediadora (como trombospondina) e outras diretamente (como VCAM, P-selectina) (63, 78). Acredita-se que o fator inicial na patogênese do AVC na doença falciforme seja a adesão de hemácias falcizadas ao endotélio vascular, com consequente ativação e dano endotelial (79).

Alta expressão de moléculas de adesão endotelial e de moléculas de adesão de hemácias relacionadas à patogênese da vaso-oclusão tem sido observada em pacientes com doença falciforme, incluindo integrinas, selectinas endoteliais, moléculas de adesão solúveis e membros da família das imunoglobulinas (76). A adesão de hemácias falciformes na microvasculatura causa o aprisionamento de células mais densas e menos deformáveis, diminuindo o fluxo sanguíneo e aumentando o tempo de trânsito nos capilares. Isso favorece e retroalimenta a polimerização das Hb S e causa a vaso-oclusão (63, 78).

Moléculas de adesão, quimioatrativos e citocinas atraem leucócitos para o local, podendo causar obstrução microvascular e isquemia (76). O estado ativado de leucócitos causado pelo estado inflamatório crônico típico da doença falciforme faz com que número significativo de leucócitos exiba níveis elevados de moléculas que podem se ligar ao endotélio. A adesão anormal de hemácias e leucócitos ocorre principalmente em vênulas pós-capilares onde as tensões de cisalhamento são suficientemente baixas para permitir a adesão de células do sangue à parede vascular. A adesão celular ao endotélio também pode ocorrer em grandes artérias. Entretanto, não se sabe se a adesão anormal de hemácias e leucócitos ocorre em grandes artérias cerebrais de pacientes com doença falciforme, culminando na ocorrência de AVC (6). Alternativamente, a adesão anormal aconteceria em vênulas de grandes artérias e o processo fisiopatológico aconteceria da parte externa para dentro do vaso.

Em resposta à anemia crônica e hipóxia, o fluxo de sangue no cérebro é significativamente aumentado na doença falciforme (80). Qualquer decréscimo no fluxo sanguíneo cerebral por razões fisiológicas ou patológicas acarreta um risco de desequilíbrio entre oferta e demanda de oxigênio no cérebro, e o risco de doença cerebrovascular ocorre (6). O aumento da hipóxia e a incapacidade da vasculatura cerebral em se dilatar levam à isquemia (80).

Além disso, a hipóxia e isquemia podem aumentar a expressão de vários receptores de moléculas de adesão (VCAM1, ICAM1, E-selectina) no endotélio microvascular do cérebro humano. A transcrição aumentada de vários genes envolvidos na angiogênese, inflamação, regulação do tônus vascular, proliferação celular, apoptose e coagulação em situações de hipóxia poderiam contribuir para o desenvolvimento da vasculopatia cerebral (6).

Após a exposição temporária à hipóxia seguida pela reoxigenação para induzir falcização reversível, camundongos transgênicos exibem uma resposta inflamatória excessiva, caracterizada por aumento da adesão e extravasamento de leucócitos na microvasculatura e evidência de produção de oxidantes no endotélio vascular (63). Esse estado pró-inflamatório leva a hiperplasia da camada íntima, fibrose e, por fim, oclusão do lúmen (79). A proliferação da camada íntima induz estenose progressiva das porções intracraniana da artéria afetada (Figura 7) (78). Dessa forma, é indiscutível a importância do papel da inflamação, hipóxia e do processo anormal de adesão vascular na fisiopatologia do AVC isquêmico.

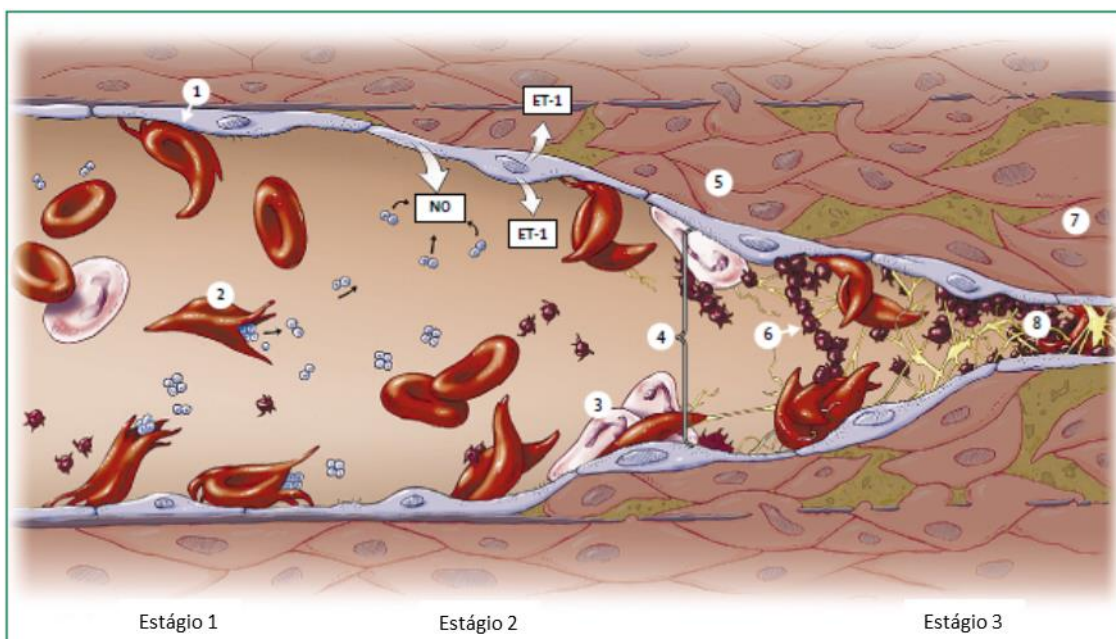


Figura 7 – Vasculopatia e AVC na doença falciforme. A hemácia falciforme é determinante no desenvolvimento da doença cerebrovascular, como resultado da adesão anormal ao endotélio vascular (1) e hemólise (2). Esses fatores resultam em um estado pró-inflamatório, manifesto em parte pela adesão de leucócitos (3) e agregação plaquetária. Secreção aumentada de endotelina (ET-1) e sequestro do óxido nítrico (NO) pela hemoglobina livre resulta em tônus vasomotor aumentado (4). Ocorre o estreitamento do lúmen como consequência da proliferação das células da musculatura lisa e fibroblastos dentro da camada íntima da artéria (5). O resultado final é a vasculopatia (7) e a oclusão (8).

Fonte: modificado de (63).

O papel da hemólise é evidente na fisiopatologia da doença cerebrovascular. A hemoglobina livre resultante da hemólise crônica e aguda, características típicas da doença falciforme, interfere no metabolismo do NO. A liberação de Hb livre no plasma causa consumo do NO local. A liberação de arginase oriunda da hemólise consome a L-arginina, substrato para produção de NO. A hemoglobina livre, o heme e o ferro heme catalisam a produção de radicais livres de oxigênio, potenciais consumidores de NO e ativadores do endotélio. A diminuição da biodisponibilidade de NO e a formação de radicais livres levam à disfunção endotelial, aumentam a inflamação e contribuem para um estado de hipercoagulabilidade da doença falciforme. Além disso, a diminuição da biodisponibilidade de NO limita o relaxamento da musculatura lisa dos vasos sanguíneos, causando aumento da resistência vascular (6, 44).

A diminuição da biodisponibilidade de NO reduz a vasodilatação e prejudica a inibição da ativação e agregação plaquetária relacionada ao NO, e também inibe a repressão da transcrição de moléculas de adesão celular (44). Apesar de não estar claro o papel da modificação da via da regulação do tônus vascular na fisiopatologia do AVC, há evidências que dão suporte a seu envolvimento, tais como a redução do nível de hemoglobina livre no plasma e a redução da hemólise causadas pela terapia transfusional crônica (76). O efeito protetor da coexistência de α -Tal também seria uma evidência nesse mesmo sentido (78).

Anormalidades no sistema da coagulação têm sido relatadas em pacientes com doença falciforme, gerando um estado de hipercoagulabilidade. Marcadores de coagulação e fibrinólise estão aumentados no estado basal de pacientes com doença falciforme e mais ainda durante crises de vaso-oclusão (63). Entretanto, a relação desses marcadores com AVC não está totalmente elucidada (76, 78). A concentração baixa de proteína C e S foram associadas ao histórico de AVC (81), bem como concentração alta de Dímero D (82).

3.6.4 Prevenção do Risco

O Doppler transcraniano cerebral (DTC), que mede as velocidades de fluxo sanguíneo nos vasos cerebrais, é importante ferramenta na detecção precoce de indivíduos com doença falciforme em risco de sofrer AVC isquêmico. Comparado com o teste padrão ouro, angiografia cerebral, ele apresenta sensibilidade de 90% e especificidade de 100% na detecção de estenose. O DTC subsidia a inclusão dos indivíduos de alto risco em regime de transfusão crônica para evitar a ocorrência do primeiro episódio de AVC (3).

O estudo STOP, um ensaio clínico controlado e randomizado realizado em crianças com anemia falciforme e risco elevado de desenvolvimento de AVC detectado pelo DTC (velocidade média máxima na artéria carótida interna ou cerebral média \geq 200 cm por segundo), mostrou uma diferença de 92% no risco do primeiro AVC comparando-se o grupo tratado em regime de transfusão regular crônica com o grupo submetido ao tratamento padrão (observacional). Crianças com a velocidade do fluxo sanguíneo cerebral na artéria cerebral média ou na artéria carótida interna igual ou superior a 200 cm/s possuem risco de 10% ao ano de desenvolverem AVC, que pode ser reduzido para menos de 1% com o regime de transfusão crônica (9). O estudo STOP foi interrompido devido a essa evidência. Baseando-se nos resultados do estudo, o *National Institute of Health* (NIH) recomendou o rastreamento de crianças com anemia falciforme pelo DTC para avaliação do risco de desenvolvimento de AVC isquêmico e o regime de transfusões crônicas como medida preventiva para as crianças sob alto risco.

Consequentemente, houve redução de 45% da incidência de hospitalizações por causa de AVC nos EUA, assim como redução de 45% do tempo de internação e de 24% das taxas hospitalares atribuídas ao AVC, quando foram comparadas as era pré e pós publicação do estudo STOP (83).

Com a introdução do rastreamento pelo DTC, diversos trabalhos realizados em regiões diferentes do mundo têm sido publicados relatando a adesão ao protocolo, bem como a diminuição da incidência de AVC isquêmico em crianças com anemia falciforme (32, 84-87). Dados recentes do *Centre Hospitalier Intercommunal*, França, mostraram que o DTC aliado à intensificação terapêutica (regime de transfusão regular, transplante de medula óssea ou terapia com HU) reduziu o risco de AVC até os 18 anos de 11% para 1,9% (32).

O estudo STOP 2 avaliou a possibilidade de interrupção do regime de transfusão crônica após normalização da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral em crianças com anemia falciforme e risco elevado de desenvolvimento de AVC detectado pelo DTC. O estudo também teve que ser interrompido após evidências de que a interrupção do regime de transfusões poderia causar a reversão da velocidade de fluxo sanguíneo cerebral para níveis de risco elevado ou AVC isquêmico (88).

Recentemente, o NIH interrompeu o ensaio clínico TWiTCH (*Transcranial Doppler with Transfusions Changing to Hydroxyurea*) antes do previsto pois os desfechos estabelecidos foram alcançados. O objetivo desse estudo foi avaliar se o tratamento com hidroxíureia (HU) diminui a VMM de fluxo sanguíneo em crianças com doença falciforme em um grau similar ao regime de transfusões crônicas. Crianças com doença falciforme em regime de transfusões crônicas para prevenção de AVC (tempo médio de 4,6 anos) foram randomizadas para continuar recebendo o regime de transfusões ou interromper as transfusões e iniciar o tratamento com HU. Apesar dos resultados ainda não terem sido publicados, sabe-se que a HU não foi inferior ao regime de transfusões crônicas na redução das velocidades de fluxo sanguíneo cerebral em crianças com doença falciforme sob alto risco de desenvolvimento de AVC (89).

3.6.5 Tratamento do AVC isquêmico

Na fase aguda do AVC isquêmico é necessária transfusão sanguínea de troca imediata para reduzir a Hb S para níveis inferiores a 30%, seguida de programa transfusional continuado para manter a concentração abaixo desse nível. Essa terapia reduziu a taxa de reincidência de 50% para cerca de 10%, em um estudo com três anos de acompanhamento (90). Em estudo de coorte onde participaram pacientes de 14 centros de referência no EUA, a frequência de recorrência em pacientes que receberam transfusão por no mínimo cinco anos foi de 22% (2,2 por 100 pacientes/ano) (91). Em outro estudo realizado nos Estados Unidos, nenhum dos 15 pacientes submetidos a essa terapia tiveram recorrência do evento durante 1.023 pacientes/meses de terapia (92). A diminuição dos níveis plasmáticos da hemoglobina livre reduziria os efeitos tóxicos dos produtos da degradação da hemoglobina na disfunção endotelial, com aumento da

biodisponibilidade do óxido nítrico. Isso ajudaria a explicar o papel das transfusões na prevenção do AVC (93).

A terapia transfusional, infelizmente, traz riscos para os pacientes. Como a retirada do tratamento transfusional pode acarretar a recorrência de AVC, a terapia com HU tem sido aventada como alternativa, sendo o uso iniciado antes do fim do período de transfusões (19, 94). Entretanto, a terapia com HU possui eficácia reduzida na prevenção da recorrência de AVC, quando comparada com o programa transfusional continuado (95, 96).

3.6.6 Fatores de risco genéticos, laboratoriais e clínicos para o desenvolvimento de AVC isquêmico

Vários estudos têm sido realizados para tentar estabelecer fatores de risco ou, inversamente, protetores ao desenvolvimento de AVC em indivíduos com doença falciforme. Entretanto, a associação da vasculopatia subjacente ao AVC com esses fatores não está bem estabelecida.

A patogênese do AVC na doença falciforme provavelmente envolve uma combinação entre a mutação no gene beta da globina ($HBB:c.20A>T$), genes modificadores e fatores ambientais. A predisposição genética ao AVC na doença falciforme tem sido sugerida pelo fato de a ocorrência de AVC entre irmãos e gêmeos estar aumentada (65, 97).

O risco de AVC em indivíduos com doença falciforme pode envolver muitos genes, dentro e fora do *locus* do *HBB*. Genes relacionados ao processo de inflamação, resposta imune, coagulação, adesão celular, metabolismo de lipídios, regulação da pressão sanguínea, hipóxia, entre outros, são candidatos a estarem envolvidos com o desenvolvimento de AVC. Esses genes têm sido associados com maior suscetibilidade ou proteção à ocorrência do evento (98). Há evidências de que o processo de inflamação seria o mais implicado no desenvolvimento de AVC nas artérias do polígono de Willis (99). Entretanto, apesar de muitos outros marcadores genéticos terem sido propostos, existe controvérsia entre os resultados dos estudos e há necessidade de confirmação e

validação. O efeito protetor de α -Tal contra o desenvolvimento de doença cerebrovascular está bem estabelecido na literatura (32, 52-54, 56, 67, 69, 100-102).

Com relação aos parâmetros laboratoriais, destaca-se na literatura a relação dos marcadores de hemólise com a ocorrência de doença cerebrovascular, tais como, nível da hemoglobina total, reticulócitos e lactato desidrogenase (LDH) (10, 18, 32, 52, 53, 56, 67-70, 103, 104).

Sobre as características clínicas associadas ao desenvolvimento de doença cerebrovascular, fatores que acarretam em desequilíbrio entre oferta e demanda de oxigênio no cérebro são críticos. Como exemplo, pode-se citar a aplasia medular associada à infecção pelo eritrovírus B19 (105), hipoxemia noturna (106) e ocorrência de síndrome torácica aguda (52).

O quadro 3 sintetiza características e resultados de estudos que avaliaram a influência de fatores genéticos, laboratoriais e/ou clínicos na ocorrência de doença cerebrovascular em indivíduos com doença falciforme. Estudos abordando fatores de risco para infartos silenciosos e AVC hemorrágico isoladamente não foram incluídos.

Quadro 3 – Estudos publicados na literatura científica que avaliaram fatores de risco para doença cerebrovascular em indivíduos com doença falciforme

Referência	Tipo de estudo	Desfecho(s) estudado(s)	Características da população estudada			Fatores estudados	
			Número	Genótipo	Média de idade, anos	Fatores de risco	Fatores protetores
Powars et al., 1991 (107)	Coorte	Infarto cerebral ou hemorragia intracraniana	785	SS	Casos: 13,1 (0,6 a 47,1)	Haplótipo β^S CAR	Talassemia alfa
Balkaran et al., 1992 (62)	Coorte	Infarto cerebral	310	SS	9 a 17	\uparrow Hb A2, \uparrow Leucócitos	
		Infarto cerebral				Alta velocidade do fluxo sanguíneo cerebral	
Adams etl al., 1992 (108)	Coorte	Ultra-sonografia positiva (≥ 170 cm/s)	190	SS	$8,9 \pm 4,2$ (3 a 18)	Infarto cerebral	
Rodgers et al 1993 (109)	Caso controle	AVC	89	SS	7 a 44	\uparrow pressão arterial sistólica, \uparrow pressão arterial diastólica	
de Montalembert et al., 1993 (110)	Caso controle	Acidente cerebrovascular	444	SS ou SC	1 a 43	Meningite bacteriana	
Adams etl al., 1994 (111)	Coorte	Infarto cerebral ou hemorragia intracraniana	300	SS	AVC: $7,5 \pm 3,5$ Sem AVC: $7,7 \pm 4,7$	Ausência de talassemia alfa, \downarrow talassemia alfa, \downarrow Hct, \uparrow HCM, \uparrow CHCM, \uparrow reticulócitos, \downarrow HbF	
Gill el al., 1995 (100)	Coorte	Acidente cerebrovascular	310	SS	Idade de entrada: $3,0 \pm 1,4$ (acompanhamento $4,2 \pm 2,6$)		Talassemia alfa
Tam 1997 (81)	Caso controle	AVC	13	SS	$12,6 \pm 2,9$	\downarrow Proteína C, \downarrow proteína S	
Houston et al., 1997 (112)	Transversal	AVC isquêmico	99	SS ou $S\beta^0$ -tal	19 (1 a 58)	\uparrow Homocisteína	
		Infarto cerebral ou hemorragia intracraniana				TAMM (ACM/ACI) ≥ 200 cm/s	
Adams etl al., 1997 (10)	Coorte	TAMM ≥ 200 cm/s	315	SS ou $S\beta^0$ -tal	$8,8 \pm 4,2$ (3 a 18,8)	\downarrow idade, \downarrow Hct, \uparrow leucócitos, \uparrow reticulócitos	
Pegelow et al., 1997 (113)	Coorte	AVC oclusivo	3317	SS ou SC	2 a 44	\uparrow pressão arterial sistólica	

Kahn et al., 1997 (114)	Coorte	Histórico de AVC	82	SS, SC ou Sβ ⁺ -tal	10,5 (48 dias a 31 anos)	↑idade, SS genótipo	SC genótipo
Ohene-Frempong et al., 1998 (52)	Coorte	Infarto cerebral completo	3.943	SS, SC, Sβ ⁺ , ou Sβ ⁰	14,2 ± 12,7	AIT prévio, ↓Hb, STA, ↑pressão arterial sistólica	Talassemia alfa
Neonato et al., 2000 (102)	Coorte	AVC (oclusivo ou hemorrágico)	299	SS	10,1 ± 5,8		Talassemia alfa
Styles et al., 2000 (115)	Caso controle	Infarto cerebral	53	SS	12,9 ± 5,6	Alelos HLA B*5301, DRB1*0301, DRB1*0302, DQB1*0201	Alelos HLA B*4501, DRB1*1501, DRB1*1503, DQB1*0602
Hoppe et al., 2001 (116)	Caso controle	Infarto cerebral	69	SS	Casos 7.1 ± 3.5 Controles 16.5 ± 8.7		CBS 278thr
Kirkham et al., 2001 (106)	Coorte	Eventos do sistema nervoso central (AVC, AIT ou convulsões)	149	SS, SC ou Sβ-tal	Mediana 7,7 (1-23,1)	↑velocidade ACI ou ACM durante o sono, genótipo SS, ↑Hb, ↓ SaO ₂ noturna	↑Oxigênio médio
Tang et al., 2001 (117)	Caso controle	Acidente cerebrovascular	63	Não informado	2 a 21	Alelos do gene do angiotensinogênio sz22 e/ou sz24	
Sarnaik et al., 2001 (118)	Série de casos	Infarto cerebral	41	SS	5,6 ± 3,2	Gênero feminino; Haplótipo β ^s Ben/CAR, atípico, CAR/CAR	Talassemia alfa
Miller et al., 2001 (119)	Coorte	AVC isquêmico	248	SS	8,3 ± 1,9	Infartos silenciosos, AIT prévio (associação marginal), meningite bacteriana (associação marginal), ↑Hct, ↑aspartato aminotransferase	
Taylor et al., 2002 (120)	Caso controle	AVC sintomático	102	SS	17,1±7,4 (casos)		SNP VCAM-1 G1238C
Taylor et al., 2002 (121)	Caso controle	AVC sintomático	102	SS	17,1±7,4 (casos)	↑Leucócitos	
Hoppe et al., 2003 (98)	Coorte	Infarto cerebral em grandes vasos	231	SS	13,1 ± 2,9	Alelos HLA HLA-A*0102 e HLA-A*2612	Alelos HLA HLA-A*3301
Hsu et al., 2003 (53)	Dados do estudo STOP	Infarto cerebral em pequenos vasos	225	SS ou Sβ ⁰ -tal	2 a 16	Alelos HLA DPB1*0401	Alelos HLA DPB1*1701
Hsu et al., 2003 (53)	Dados do estudo STOP	DTC anormal (≥ 200 cm/s)	225	SS ou Sβ ⁰ -tal	2 a 16	↓Idade, ↓Hb	Talassemia alfa-2, ↓VCM
Driscoll et al., 2003 (97)	Coorte	AVC clínico (oclusivo ou hemorrágico)	2353	SS	≤21	Irmão com histórico de AVC	
Kwiatkowski et al., 2003 (65)	Coorte	DTC positivo (≥170 cm/s)	249	SS ou Sβ ⁰ -tal	10,1 ± 4,9 (1,9 a 20,9)	Irmão com histórico de DTC positivo	↑Hb

		Infarto cerebral em grandes vasos				IL4R 503P, HLA-A	ADRB2 27E, TNF- α -308A
Hoppe et al., 2004 (122)	Coorte	Infarto cerebral em pequenos vasos	230	SS	8,4 \pm 1,7	VCAM1 (-1594)C, Homozigose de alelos HLA	LDLR (éxon18) Ncol-
Romana et al., 2004 (123)	Coorte	Acidente cerebrovascular	156	SS	2 a 18	Alelo sz28 do gene angiotensinogênio	
Sebastiani et al., 2005 (124)	Coorte	AVC sintomático	1398	SS		Uma rede bayesiana de 69 SNPs em 20 genes descrevendo associação conjunta com AVC foi estabelecida. Desses, 25 SNPs em 11 genes foram diretamente associados ao evento.	
Kwiatkowski et al., 2006 (125)	Dados do estudo STOP	AVC	1.975	SS ou S β^0 -tal	8,1	ACA \geq 170 cm/s	
Hoppe et al., 2007 (126)	Dados do estudo STOP	Doença dos grandes vasos (estenose ou obstrução)	96	SS	9,5 \pm 4,2 (1,8 to 17,7)	Alelo IL4R 503P	Alelos TNF(-308)A e LTC4S(-444)C
Bernaudin et al., 2008 (67)	Coorte	DTC anormal (\geq 200 cm/s)	373	SS	3,1 (1,5 to 8,3) idade mediana no momento do DTC	Ausência de talassemia alfa, deficiência de G6PD, \uparrow LDH	\uparrow Hb
Rees et al., 2008 (18)	Coorte	Velocidade média máxima	96	SS	2 a 16	Correlação positiva: AST Correlação negativa: Hb, idade	
Quinn et al., 2008 (127)	Caso controle aninhado	AVC clinicamente manifesto	412	SS ou S β^0 -tal	casos 8,5 controles 9,5	\downarrow SpO ₂ , \downarrow idade	
Chang Milbauer et al., 2008 (99)	Experimental	DTC anormal (\geq 200 cm/s), MRA anormal ou AVC isquêmico clínico	20	SS ou S β^0 -tal	4 a 19	Sistema de sinalização biológico da inflamação	
Hellani et al., 2009 (128)	Caso controle	DTA anormal	48	SS	37,6	Deficiência G6PD	
Rees et al., 2009 (68)	Coorte	DCV (DTC anormal, DTC condicional, MRA anormal ou AVC)	218	SS	Crianças	\uparrow HCM, \uparrow LDH	
Quinn et al., 2009 (129)	Transversal	Velocidade média máxima DTC anormal (\geq 200 cm/s)	181	SS ou S β^0 -tal	8,0 (3,2 to 13,5)	Correlação positiva: "proxy" de medida de estenose Correlação negativa: SpO ₂ diurno, idade, Hct \downarrow SpO ₂ diurno	
Makani et al., 2009 (130)	Coorte	Velocidade do fluxo sanguíneo cerebral alta	105	SS	7,4 \pm 4,0	histórico de 3 ou mais episódios de febre e SpO ₂ \leq 95% periférica	

Belisario et al., 2010 (54)	Coorte	DCV (AVC isquêmico ou DTC ≥ 170 cm/sec)	208	SS	6,5 \pm 2,3 (2,5 a 10,4)	Ausência de talassemia alfa
Pavlakís et al., 2010 (131)	Dados do estudo BABY HUG	Velocidade média máxima	192	SS ou S β^0 -thal	12,6 meses (7 a 17)	Correlação positiva: idade, reticulócitos Correlação negativa: Hb
Deane et al., 2010 (132)	Coorte	Velocidade média máxima nas artérias carótidas internas extracranianas AVC isquêmico	236	SS	2 a 16	Correlação positiva: LDH Correlação negativa: idade Estenose extracraniana
Cajado et al., 2011 (133)	Transversal	AVC	210	SS	9,3 \pm 4,5	
Silva et al., 2011 (70)	Transversal	DCV (AVC isquêmico ou DTC de alto risco)	262	SS ou S β^0 -tal	mediana 6,2 (2 a 11,2)	\uparrow Contagem de reticulócitos
Flanagan et al., 2011 (101)	Caso controle	AVC isquêmico	233	SS	Casos: 5,8 \pm 2,8 Controles: 10,2 \pm 3,5	ANXA2 (rs11853426), TEK (rs489347), Talassemia alfa, ADCY9 (rs2238432) TGFBR3 (rs284875)
Filho et al., 2011 (55)	Caso controle	DCV (AVC isquêmico, AIT ou DTC de alto risco)	94	SS	6,6 (3,2 a 15)	Haplótipo β^S Car/Atp
		DTC anormal	217			Deficiência G6PD, ausência de talassemia alfa, \uparrow contagem de reticulócitos
		MRA anormal	132			Deficiência G6PD, \uparrow LDH
Bernaudin et al., 2011 (32)	Coorte	Vasculopatia cerebral (AVC, DTC anormal, MRA anormal ou infarto silencioso)	217	SS, S β^0 ou SD-Punjab	Média de seguimento: 7,7 \pm 5,0	\uparrow contagem de reticulócitos, \uparrow LDH
Vicari et al., 2011 (103)	Transversal	MRA anormal Estenose arterial na MRA	49	SS	mediana 23 (13 a 55)	\downarrow Hb, \uparrow LDH
Hyacinth et al., 2012 (104)	Estudo transversal prospectivo, aninhado	DTC anormal AVC	40	Sujeitos: SS e S β^0 Controles: SS e saudáveis	Controles: 9,6 \pm 1,7 SS com DTC normal: 8,8 \pm 2,3 SS com DTC anormal: 8,1 \pm 3,1	\uparrow BDNF, \uparrow PDGF-AA, \uparrow reticulócitos, \downarrow Hb \uparrow PDGF-AA, \uparrow leucócitos
Ataga et al., 2012 (82)	Coorte	AVC	52	SS, S β^0 ou SD	37,5 (26,75 to 46,25)	\uparrow Dímero D
Thangarajh et al., 2012 (57)	Dados do estudo SIT	vasculopatia intracraniana definida por MRA	516 (Análise genética 191 homens)	SS ou S β^0 -tal	9,1 (5 a 15)	Infarto silencioso, Deficiência G6PD

Leite et al., 2012 (71)	Transversal	DTC anormal ou condicional	773	SS, SC e S β^0 -tal	6,5 (1,8 to 15,8)	Genótipo SS, Complicações da doença falciforme, anormalidades laboratoriais, DTC como método de triagem	Coexistência de talassemia
Flanagan et al., 2013 (134)	GWAS e WES em coorte	AVC clínico primário	677	SS	Grupo com AVC: 12,1 \pm 4,1 Grupo sem AVC: 12,9 \pm 3,7		Foram identificadas 22 variantes não sinonimas. Mutações GOLGB1 Y1212C e ENPP1 K173Q foram validadas.
Domingos et al., 2014 (56)	Coorte	Susceptibilidade ao AVC (AVC primário ou DTC com velocidade \geq 170 cm/s) AVC primário AVC primário ou DTC com velocidade \geq 170 cm/s	261	SS	Não informado	Gênero feminino, \downarrow hemácias, \downarrow Hb, \uparrow reticulócitos, \downarrow bilirrubina indireta, \uparrow LDH, \downarrow Hb F Haplótipo β^S CAR/CAR	Hb F, Talassemia alfa
Cox et al., 2014 (69)	Coorte	Velocidade do fluxo sanguíneo cerebral	601	SS	9,76 \pm 3,86 (0,6 a 22,6)	Correlação negativa: Idade, Hb	Talassemia alfa
Meier et al., 2014 (135)	Coorte	AVC	354	SS	145 \pm 33 dias na entrada	\uparrow reticulócitos	
Lagunju et al., 2014 (20)	Coorte	Velocidade média máxima elevada	237	SS	101,8 \pm 47,9 meses	\downarrow idade, \downarrow Hb, \downarrow Hct, \downarrow SpO2	
Belisário et al., 2015 (136)	Coorte	AVC isquêmico DCV	386	SS	9,63 \pm 2,99	TNF- α -308G>A	Talassemia alfa Talassemia alfa
Joly et al., 2015 (137)	Coorte	Vasculopatia cerebral (AVC, IS ou DTC anormal)	121	SS	Grupo sem Vasculopatia=8,6 \pm 4,3 ; Grupo com vasculopatia=9,1 \pm 4,5	Ausência de talassemia alfa	Ausência de deficiência de G6PD
Meier et al., 2015 (138)	Coorte	DTC alto risco ou condicional	121	SS	5,8 \pm 3,0	\uparrow reticulócitos, \downarrow Hb	

*Quando os estudos apresentavam análises univariada e multivariada, apenas o resultado da análise multivariada foi levado em consideração. ACA significa artéria cerebral anterior; ACI, artéria carótida interna; ACM, artéria cerebral média; ADCY9, adenilato ciclase 9; ADRB, *beta adrenergic receptor*; AIT, ataque isquêmico transitório; ANXA2, anexina A2; AST, aspartato aminotransferase; Atp, atípico; AVC, acidente vascular cerebral; BDNF, *brain derived neurotropic factor*; Ben, Benin; CAR, *Central African Republic*; CBS, cystathionine β -synthase; CHCM, Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; DTC, Doppler transcraniano; ENPP1, ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 1; GOLGB1, golgina B1; GWAS, *genome-wide association study*; Hb, hemoglobina; HCM, hemoglobina corpuscular média; Hct, hematócrito;

HLA, *Human leukocyte antigen*; IL4R, receptor de interleucina 4; IS, infarto silencioso; LDH, Lactato Desidrogenase; LDLR, *low density lipoprotein receptor*; MRA, *magnetic resonance angiogram*; PDGF, *platelet derived growth factor*; SpO2, saturação periférica de oxigênio; STA, síndrome torácica aguda; STOP, *Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Disease*; TEK, tirosina quinase; TGFBR3, receptor do fator de transformação do crescimento beta III; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; e WES, *whole-exome sequencing*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de marcadores genéticos, laboratoriais e clínicos na ocorrência de doença cerebrovascular em crianças com anemia falciforme triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais e acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas.

4.2 Objetivos específicos

- Verificar a prevalência e incidência de AVC isquêmico e DCV na casuística estudada.
- Genotipar e determinar a frequência dos marcadores genéticos de prognóstico na casuística estudada:
 - Marcadores genéticos associados com o risco de AVC em outros estudos anteriormente publicados: alfa-talassemia, SNPs dos genes *ADCY9*, *ANXA2*, *ENPP1*, *GOLGB1*, *IL-4R S503P*, *PON1*, *TEK*, *TGFBR3*, *TNF G-308A*, *VCAM G1238C*, variantes de *G6PD A*⁻ (G202A, T968C, G680T e A542T) e *G6PD B*⁻ (C563T e G844C);
 - Haplótipos do gene da interleucina 10 (gene *IL-10*): SNPs -592, -819 e -1082;
- Verificar se há associação entre a ocorrência de AVC isquêmico ou DCV com os possíveis marcadores genéticos supracitados na casuística estudada.
- Verificar se há associação entre a ocorrência de AVC isquêmico ou DVC com os seguintes parâmetros laboratoriais na casuística estudada: concentração de hemoglobina total; concentração de Hb F; leucometria;

plaquetometria; contagem reticulocitária no sangue periférico; volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média; e atividade funcional *in vitro* da enzima G6PD.

- Verificar se há associação entre a ocorrência de AVC ou DCV com as seguintes características clínicas na casuística estudada: gênero; idade; histórico da ocorrência de síndrome torácica aguda; pressão arterial sistólica; pressão arterial diastólica; histórico de ocorrência de AIT.
- Mensurar a atividade da enzima G6PD na casuística estudada e verificar sua associação com a ocorrência das variantes genéticas G6PD A⁻ e G6PD B⁻.
- Verificar se há associação entre deficiência de G6PD com os seguintes parâmetros hematológicos: concentração de hemoglobina total; níveis de Hb F; leucometria; plaquetometria; contagem reticulocitária no sangue periférico; volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média;
- Genotipar e determinar a frequência de mutações causadoras de S β -talassemia na casuística estudada.
- Genotipar e determinar a frequência de deleções do cluster do gene da beta globina, causadoras do genótipo Hb S - Persistência hereditária da hemoglobina fetal (S/HPFH) na casuística estudada.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho e local de realização do estudo

Tratou-se de um estudo do tipo coorte retrospectiva realizado com crianças com doença falciforme, diagnosticadas pelo PTN-MG, nascidas entre 1999 e 2008 e

acompanhadas no ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte (HBH) da Fundação Hemominas.

5.2 Caracterização da casuística e metodologia de seleção

A casuística dos participantes da pesquisa abrangeu o período entre 01 de janeiro de 1999 e 31 de dezembro de 2008, quando 1.066 crianças com o perfil de hemoglobina FS foram triadas pelo PTN-MG no Estado de MG. Destas 1.066 crianças, 554 haviam sido encaminhadas para acompanhamento clínico no ambulatório do HBH. Foram excluídas 49 crianças que já haviam falecido quando o presente estudo se iniciou (março de 2011), 32 crianças que haviam sido transferidas para tratamento em outro ambulatório e uma criança que realizava acompanhamento clínico em clínica privada. Os motivos das exclusões foram a indisponibilidade para coleta da amostra biológica, impossibilidade de esclarecimento e obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e a falta de informações relativas ao acompanhamento clínico-laboratorial. As 472 crianças restantes foram preliminarmente admitidas no estudo. A inclusão de participantes na pesquisa finalizou em dezembro de 2014. Das 472 crianças elegíveis, os pais de seis não permitiram a participação no estudo, quatro foram transferidas para tratamento em outro ambulatório após o início do estudo, quatro faleceram durante a realização do estudo, uma criança fazia acompanhamento irregular (foi excluída devido à falta de dados clínicos e hematológicos) e 16 não foram encontradas para coleta de amostras de sangue e/ou TCLE. Adicionalmente, uma criança que teve AVC hemorrágico de causa desconhecida foi excluída. A figura 8 representa, graficamente, o procedimento de seleção adotado.

Dessa forma, os critérios de inclusão utilizados nessa pesquisa foram:

- crianças triadas pelo PTN-MG, com perfil hemoglobínico compatível com anemia falciforme (padrão neonatal FS, SF ou SS determinado por HPLC e/ou eletroforese com focalização isoelétrica) e acompanhadas no HBH, nascidas entre 01 de janeiro de 1999 e 31 de dezembro de 2008;
- Consentimento livre e esclarecido dos pais ou responsáveis e assentimento da criança, quando aplicável.

Os critérios de exclusão utilizados nessa pesquisa foram:

- crianças com perfil hemoglobínico compatível com outros subtipos de doença falciforme, ou seja, FSC e FSA ($S\beta^+$ -talassemia);
- crianças que foram a óbito por qualquer razão;
- crianças que não puderam ser encontradas durante o período de realização do estudo, para obtenção do consentimento e/ou amostra biológica;
- crianças transferidas para acompanhamento em outro ambulatório;
- crianças cujo pais ou responsáveis não aceitaram a participação no estudo.

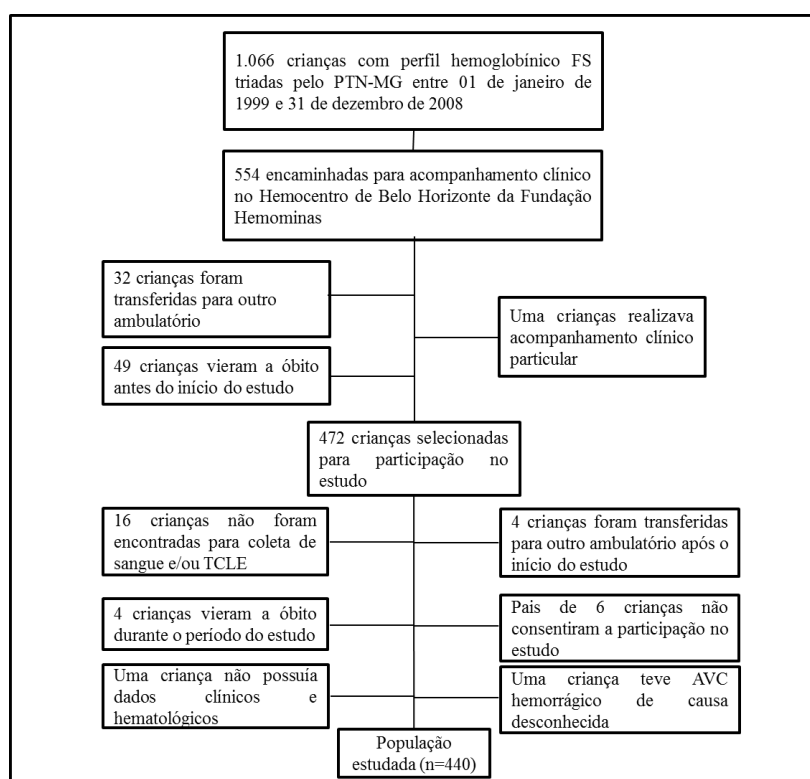


Figura 8 – Fluxograma da seleção da casuística estudada

As informações utilizadas na seleção da casuística foram retiradas do banco de dados do PTN-MG.

Foram utilizadas informações referentes ao acompanhamento clínico e laboratorial da casuística de estudo no período compreendido entre 01 de janeiro de 1999 (início do acompanhamento da coorte) e 31 de dezembro de 2014 (término do acompanhamento da coorte), de modo que todas as crianças foram acompanhadas, por no mínimo, seis anos. Dessa forma, evitou-se ao máximo incluir crianças cujo risco de

AVC ou DVC fosse muito pequeno, uma vez que a maior incidência de AVC isquêmico ocorre entre dois e cinco anos de idade (52). Todas as informações pessoais, laboratoriais e clínicas dos participantes do estudo foram retiradas dos prontuários médicos arquivados no ambulatório do HBH e lançadas em um banco de dados elaborado na plataforma do programa Microsoft Access®.

5.2.1 Casuística de crianças com o perfil hemoglobínico sugestivo de $S\beta^+$ -talassemia

Com intuito de identificar as mutações causadoras de $S\beta$ -talassemia ($S\beta$ -tal) em Minas Gerais, uma casuística adicional de crianças foi incluída no estudo. A casuística adicional foi retirada do período compreendido entre 01 de janeiro de 1997 e 31 de dezembro de 2013. As crianças com resultados da triagem neonatal e testes complementares sugestivos de $S\beta^+$ -talassemia ou $S\beta^0$ -talassemia foram selecionadas para participação no estudo. Das 96 crianças elegíveis, 59 foram incluídas no estudo após consentimento livre e esclarecido. Todas as crianças fazem acompanhamento clínico no ambulatório do HBH da Fundação Hemominas.

5.3 Coleta de amostra, extração e quantificação do DNA genômico

As amostras de sangue para utilização no estudo foram derivadas de coleta para exames de rotina do acompanhamento clínico das crianças selecionadas, não sendo necessárias amostras exclusivas para a pesquisa. Dessa forma, o volume de sangue coletado foi variável, dependendo da quantidade utilizada para realização dos exames de rotina. Aproximadamente 1-3 ml de sangue foram obtidos de cada paciente por meio de punção venosa e preservados em tubo contendo EDTA.

A extração do DNA genômico (gDNA) das amostras de sangue foi realizada com o uso do kit comercial (QIAamp, DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com instruções do fabricante.

Para leitura da concentração e do grau de pureza do DNA, a amostra foi incubada à 56°C durante cinco minutos em banho seco e homogeneizado posteriormente

para garantir que o DNA estivesse solúvel. Dois μL da amostra de DNA foram depositados no espectrofotômetro (NanoVue plus, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), calibrado anteriormente com tampão AE, e a leitura realizada. A concentração do DNA em $\text{ng}/\mu\text{L}$ e a relação do grau de pureza (razão da absorvância em 260 nm / absorvância em 280 nm) foram determinadas. O DNA foi diluído para uma concentração de $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e armazenado a menos 20°C até o momento do uso.

5.4 Variáveis resposta analisadas

Os desfechos foram estudados: 1) AVC isquêmico; 2) AVC clinicamente manifesto; 3) DCV; e 4) DTC alto risco.

Para os fins propostos neste trabalho, as seguintes definições foram utilizadas:

- AVC isquêmico: síndrome neurológica aguda causada por oclusão vascular, com isquemia resultante e sintomas neurológicos focais ou sinais que duraram mais de 24 horas (9). O diagnóstico do evento foi feito pelo hemotologista responsável pelo acompanhamento clínico da criança, com base em informações clínicas e resultados de exames de imagem. O diagnóstico de AVC isquêmico foi confirmado por exames de imagem em todos os casos. AVC hemorrágico não foi considerado evento para efeito deste estudo.
- AVC clinicamente manifesto: ocorrência de pelo menos um dos eventos clínicos neurológicos seguintes: AVC isquêmico ou ataque isquêmico transitório (AIT), definido como presença de sinais neurológicos após interrupção do fluxo vascular, que se resolveram em menos de 24 horas ou 48 horas se o sistema basilar estiver envolvido (52).
- Doença cerebrovascular (DCV): ocorrência de pelo menos um dos eventos clínicos neurológicos seguintes: 1) AVC isquêmico; 2) DTC de alto risco como definido originalmente pelos investigadores do estudo STOP ($\text{VMM} \geq 200 \text{ cm/s}$ na ACM ou ACI; o teste foi considerado anormal após exame confirmatório realizado dentro de três semanas) (9); 3) exame de MRA anormal, definido como presença de estenose ou oclusão aparente de

qualquer vaso, tortuosidade arterial ou doença de Moyamoya (59); 4) dois exames de DTC consecutivos mostrando VMM \geq 170 cm/s na artéria cerebral anterior (ACA) (139); ou 5) histórico de ataque isquêmico transitório (AIT). Como alguns participantes da pesquisa tiveram vários eventos de DVC, o primeiro evento foi usado para datar a ocorrência desse desfecho. Para os participantes da pesquisa que foram submetidos a dois ou mais exames de DTC, o último exame foi considerado para definição e para datar a ocorrência de DVC. Para crianças que entraram em regime de transfusão sanguínea crônica, tratamento com hidroxíureia ou transplante de medula óssea, o resultado do último DTC antes do início da terapia foi considerado para efeito de censura dos dados.

- DTC de alto risco: VMM maior ou igual a 200 cm/s na ACM ou ACI, detectada pelo DTC como originalmente definido pelos pesquisadores do estudo STOP (9).

5.4.1 Doppler transcraniano

Os resultados dos exames de DTC utilizados na definição de DCV foram obtidos do acompanhamento clínico dos participantes do estudo. A determinação da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral nas grandes artérias do Polígono de Willis foi executada por meio da ultrassonografia transcraniana, com a utilização do Doppler pulsado de 2 MHz, com sonda acústica infantil (modelo EME TC 2000, Nicolet, Madison, EUA). Os exames foram realizados e interpretados por um único observador (Dra. Célia Maria Silva), após treinamento no *Medical College of Georgia*, EUA. O rastreamento pelo Doppler transcraniano tem sido oferecido a todas as crianças em acompanhamento no HBH, a partir dos dois anos de idade, com a criança estando sem evento clínico, na ausência de febre e em vigília. O protocolo do estudo STOP (9) tem sido utilizado desde 2007, quando o rastreamento pelo DTC foi implantado ambulatório do HBH.

O exame de MRA tem sido recomendado para complementação do teste de DTC nos seguintes casos: 1) crianças apresentando exame considerado inadequado pela médica responsável; 2) crianças com VMM em uma das ACA \geq 170 cm/s (139); 3) crianças com VMM \geq 130 cm/s na artéria basilar (70).

Os resultados dos testes do DTC foram estratificados de acordo com a classificação proposta pelo estudo STOP (9):

- a. **Teste Doppler Normal = baixo risco:** todas as velocidades médias máximas de fluxo sanguíneo cerebral inferiores a 170 cm/s, sendo imprescindível a insonação das artérias cerebrais médias, artérias carótidas internas, artérias cerebrais anteriores e artéria basilar.
- b. **Teste Doppler Condicional ou Intermediário Baixo = certo aumento de risco:** velocidade média máxima entre 170-184 cm/s em uma das cerebrais médias ou em uma das carótidas internas.
- c. **Teste Doppler Condicional ou Intermediário Alto = aumento significativo de risco:** velocidade média máxima entre 185-199 cm/s em uma das cerebrais médias ou em uma das carótidas internas.
- d. **Teste Doppler Anormal = risco alto:** velocidade média máxima maior ou igual a 200 cm/s em uma das cerebrais médias ou em uma das carótidas internas.
- e. **Teste Doppler Inadequado = risco indefinido:** ausência de insonação de uma das artérias cerebrais médias de ambos os lados ou de um dos lados, estando o lado contralateral normal. Se a velocidade máxima média na artéria contralateral houver sido superior ou igual a 200 cm/s, o exame foi considerado anormal (risco alto). Velocidade do fluxo sanguíneo cerebral nas artérias cerebrais médias abaixo de 70 cm/s também foi considerada como exame inadequado.

Para ser considerado como anormal (risco alto), o valor elevado tinha de ser confirmado por outro exame com intervalo de uma a quatro semanas. Se a criança fosse então considerada como de alto risco para desenvolvimento de AVC isquêmico, ela era encaminhada para tratamento preventivo primário do evento, seguindo as orientações das diretrizes brasileiras para doppler transcraniano em crianças e adolescente com doença falciforme (140).

5.5 Variáveis explicativas

As variáveis explicativas estudadas foram divididas em três grupos: variáveis genéticas, laboratoriais e clínicas.

5.5.1 Variáveis genéticas

As características e condições das reações de biologia molecular usadas para genotipagem das variáveis genéticas estudadas estão descritas abaixo e resumidas na tabela 1.

Tabela 1 – Condições das reações de genotipagem das variáveis genéticas estudadas e a forma de interpretação dos resultados

Variante	Técnica molecular	Oligonucleotídeo 5'-3'/ endonuclease	Termociclagem	Quantidade de MgCl ₂	Interpretação dos resultados
Alelo β ^S	PCR/RFLP	D: TGATGGTATGGGGCCAAGA	95°C, 5 min	3 mM	AA 201 + 180 + 45 + 27 + 22 + 13
		R: GGGTGGGAAAATAGACCAATA	95°C, 30 seg; 52°C, 30 seg; 72°C, 30 seg X 30 ciclos		AT 381 + 201 + 180 + 45 + 27 + 22 + 13
		5U DdeI; 37°C, por 15 min	72°C, 5 min		TT 381 + 45 + 27 + 22 + 13
Talassemia alfa	gap-PCR múltipla	Tabela 2	96°C, 15 min	NA	αα/αα 1800
			98°C, 45 seg; 62°C, 90 seg; 72°C, 135 seg X 30 ciclos		αα/α ^{-3.7} 1800 + 2022/2029
			72°C, 5 min		α ^{-3.7} /α ^{-3.7} 2022/2029
ADCY9 rs2238432	PCR/RFLP	D: AGTTGTCCGGTCCGAGTTGTA	95°C, 5 min	2,5 mM	GG 146 + 60 + 49 + 19 + 8
		R: TGGCTCTGGCTGTCCTGAT	95°C, 30 seg; 61°C, 30 seg; 72°C, 30 seg X 35 ciclos		GA 209 + 146 + 60 + 49 + 19 + 8
		2U BsmFI; 37°C, <i>overnight</i>	72°C, 5 min		AA 209 + 49 + 19 + 8
ANXA2 rs11853426	PCR/RFLP	D: AATCATGTAGCAGGGCCCG	95°C, 5 min	1 mM	CC 356 + 351
		R: TGGAGTGTAGTGGTGCATCA	95°C, 45 seg; 68°C, 45 seg; 72°C, 45 seg X 35 ciclos		CT 707 + 356 + 351
		5U HpyCH4IV; 37°C, <i>overnight</i>	72°C, 5 min		TT 707
ENPP1 rs1044498	PCR/RFLP	D: AGCAGGGAAAAAAGTGGAGT	95°C, 5 min	2 mM	CC 1109 + 261
		R: TTATGAAGCTGGGTGATGGGT	95°C, 30 seg; 64°C, 30 seg; 72°C, 30 seg X 35 ciclos		CA 1370 + 1109 + 261
		5U AvaII; 37°C, <i>overnight</i>	72°C, 5 min		AA 1370
GOLGB1 rs3732410	PCR/RFLP	D: TTTGCTCCAAGCAGAAATCAG	95°C, 5 min	2,0 mM	AA 268 + 221 + 106
		R: AATCTGGGCAACAGAAGTTCC	95°C, 30 seg; 61°C, 30 seg; 72°C, 30 seg X 30 ciclos		AG 268 + 202 + 221 + 106 + 19
		5U HpyCH4III; 37°C, <i>overnight</i>	72°C, 5 min		GG 268 + 221 + 202 + 106 + 19
IL-4R S503P rs1805015	PCR/RFLP	D: CTTACCGCAGCTTCAGCGAC	95°C, 5 min	2,5 mM	TT 120 + 20
		R: CACAGTGGTTGGCTCAGAGA	94°C, 30 seg; 60°C, 30 seg; 72°C, 30 seg X 40 ciclos		TC 140 + 120 + 20
		5U HpyCH4III; 37°C, <i>overnight</i>	72°C, 5 min		CC 140
IL-10 A-1082G rs1800896	PCR/RFLP	D: CCAAGACAACACTACTAAGGCTTCTTGAGGA	95°C, 10 min	2,5 mM	AA 360
		R: AGGTAGTGCTCACCATGACC	95°C, 30 seg; 64°C, 30 seg; 72°C, 30 seg X 35 ciclos		AG 360 + 320 + 40

		6U BseRI; 37°C, <i>overnight</i>	72°C, 10 min		GG 320 + 40
IL-10 C-819T	PCR/RFLP	D: ATCCAAGACAACACTACTAA	95°C, 5 min	2,5 mM	CC 292 + 216+82
rs1800871		R: GGCTAAATATCCTCAAAGTT	95°C, 30 seg; 56°C, 30 seg; 72°C, 60 seg X 30 ciclos		CT 508+292 + 216+82
		5U MaeIII; 37°C, <i>overnight</i>	72°C, 3 min		TT 508+82
IL-10 C-592A	PCR/RFLP	D: ATAAAATAGAGACGGTAGGG	95°C, 5 min	2 mM	CC 269
rs1800872		R: GGCTAAATATCCTCAAAGTT	95°C, 30 seg; 50°C, 30 seg; 72°C, 45 seg X 30 ciclos		CA 269 + 201 + 68
		5U RsaI; 37°C, 15 min	72°C, 5 min		AA 201 + 68
PON1	PCR/RFLP	D: TGGGAGTTAGTTCTATGTGAGCC	95°C, 5 min	2,5 mM	GG 502 + 489
rs662		R: TGGTACAAATTCCTCATCTTGTC	94°C, 30 seg; 58°C, 30 seg; 72°C, 30 seg X 30 ciclos		GA 991
		5U AlwI; 37°C, <i>overnight</i>	72°C, 5 min		AA 991 + 502 + 489
TEK	PCR/RFLP	D: GCTTCTGGGAATGTTTGCTA	95°C, 5 min	2,5 mM	GG 340 + 131
rs489347		R: GAGTTAATTCAGTTTGGGGC	95°C, 30 seg; 64°C, 30 seg; 72°C, 30 seg X 35 ciclos		GC 340 + 197 + 143 + 131
		5U DdeI; 37°C, por 15 min	72°C, 5 min		CC 197 + 143 + 131
TGFFR3	PCR/RFLP	D: TTGCCTAACCTGGGAAGCA	95°C, 5 min	2,5 mM	CC 299
rs284875		R: TTTTGGCATGGCCTTCAAAG	95°C, 30 seg; 59°C, 30 seg; 72°C, 30 seg X 35 ciclos		CT 299 +181 + 118
		5U Hpy188I; 37°C, <i>overnight</i>	72°C, 5 min		TT 181 + 118
TNF- α -308G>A	PCR/RFLP	D: AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT	95°C, 5 min		GG 87 + 20
rs1800629		R: TCCTCCCTGCTCCGATTCCG	94°C, 60 seg; 60°C, 60 seg; 72°C, 60 seg X 35 ciclos	2,5 mM	GA 107 + 87 + 20
		5U NcoI; 37°C, <i>overnight</i>	72°C, 5 min		AA 107
VCAM-1	PCR/RFLP	D: CGTTTTTGCTTGCGATTG	95°C, 5 min	2,5 mM	GG 251
rs3783613		R: CCAGTATCTTCAATGGTAGGGATG	94°C, 30 seg; 55°C, 30 seg; 72°C, 30 seg X 40 ciclos		GC 251 + 195 + 56
		2U Cac8I; 37°C, <i>overnight</i>	72°C, 3 min		CC 195 + 56
HPFH 1	gap-PCR	D: AGAATGTCACACTTAGAATGTG		2 mM	Homozigoto selvagem 1616
		R: CACTTTAATTCTGTTCTACCTGAA	94°C, 60 seg; 55°C, 60 seg; 72°C, 90 seg X 30 ciclos		Heterozigoto 1616 + 1193
		R: ACTGTGATGTTGGAAATGGAC	72°C, 10 min		Homozigoto mutante 1193
HPFH 2	gap-PCR	D: GACATGGACTATGTTC AATGA	95°C, 4 min	1,25 mM	Homozigoto selvagem 2206
		R: TTTATATATGAAATGCTACTGATT	94°C, 60 seg; 55°C, 60 seg; 72°C, 90 seg X 30 ciclos		Heterozigoto 2206 + 1950

		R: TGCTATGCCAACTCACTACC	72°C, 10 min		Homozigoto mutante 1950
HPFH 3	gap-PCR	D: GACATGGACTATTGTTCAATGA	95°C, 4 min	1,25 mM	Homozigoto selvagem 841
		R: CTTTGCTGTTTCAGGCTTAATTT	94°C, 60 seg; 59°C, 60 seg; 72°C, 120 seg X 30 ciclos		Heterozigoto 841 + 607
		R: GACACAGAGCAGTGATTGGTGCA	72°C, 10 min		Homozigoto mutante 607
G6PD A376G	PCR/RFLP	D: TGGCCAGTACGATGATGCAG	94°C, 10 min	1,5 mM	AA 90
rs1050829		R: GGCCAGGTAGAAGAGGCGGT	94°C, 45 seg; 58°C, 45 seg; 72°C, 45 seg X 30 ciclos		AG 90 + 58 + 32
		5U FokI; 37°C, 15 minutos	72°C, 7 min		GG 58 + 32
G6PD G202A	PCR/RFLP	D: GTGGCTGTTCCGGGATGGCCTTCTG	94°C, 10 min	2 mM	GG 109
rs1050828		R: CTTGAAGAAGGGCTCACTCTGTTTG	94°C, 45 seg; 61°C, 45 seg; 72°C, 45 seg X 30 ciclos		GA 109 + 63 + 46
		5U NlaIII; 37°C, 15 minutos	72°C, 7 min		AA 63 + 46
G6PD T968C	PCR/RFLP	D: TCCCTGCACCCCAACTCAAC	94°C, 10 min	1,5 mM	TT 282
rs76723693		R: CCAGTTCTGCCTTGCTGGGC	94°C, 45 seg; 65°C, 45 seg; 72°C, 45 seg X 30 ciclos		TC 282 + 162 + 120
		5U NciI; 37°C, <i>overnight</i>	72°C, 7 min		CC 162 + 120
G6PD G680T	PCR/RFLP	D: ACATGTGGCCCCTGCACCAC	94°C, 10 min	1,5 mM	GG 213 + 29
rs137852328		R: GTGACTGGCTCTGCCACCCTG	94°C, 45 seg; 69°C, 45 seg; 72°C, 45 seg X 30 ciclos		GC 213 + 115 + 98 + 29
		5U BstNI; 37°C, <i>overnight</i>	72°C, 7 min		CC 115 + 98 + 29
G6PD A542T	PCR/RFLP	R: TGGCCAGTACGATGATGCAG	94°C, 10 min	1,5 mM	AA 891 + 456
rs5030872		D: GTGACTGGCTCTGCCACCCTG	94°C, 45 seg; 69°C, 45 seg; 72°C, 45 seg X 30 ciclos		AT 1347 + 891 + 456
		10U AhdI; 37°C, <i>overnight</i>	72°C, 7 min		TT 1347
G6PD C563T	PCR/RFLP	D: TGGCCAGTACGATGATGCAG	94°C, 10 min	1,5 mM	CC 516 + 450 + 219 + 162
rs5030868		R: GTGACTGGCTCTGCCACCCTG	94°C, 45 seg; 69°C, 45 seg; 72°C, 45 seg X 30 ciclos		CT 612 + 516 + 450 + 219 + 162
		7U BseRI; 37°C, <i>overnight</i>	72°C, 7 min		TT 612 + 516 + 219
G6PD G844C	PCR/RFLP	D: ACATGTGGCCCCTGCACCAC	94°C, 10 min	1,5 mM	GG 312 + 305 + 219 + 201 + 142 + 131 + 9
rs137852318		R: CCAGTTCTGCCTTGCTGGGC	94°C, 45 seg; 69°C, 45 seg; 72°C, 45 seg X 30 ciclos		GC 447 + 312 + 305 + 219 + 201 + 142 + 131 + 9
		8U Hpy188I; 37°C, <i>overnight</i>	72°C, 7 min		CC 447 + 312 + 219 + 201 + 131 + 9

5.5.1.1 Alelo β^S

A detecção do alelo β^S foi realizada por meio de PCR-RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição – “*restriction fragments length polymorphisms*”) (Anexo 1).

5.5.1.2 Talassemia Alfa

O diagnóstico molecular de α -Tal foi realizado por meio de gap PCR múltipla, utilizando protocolo previamente publicado com modificações (141) (Anexo 2). A α -Tal é um dos principais moduladores genéticos do fenótipo da doença falciforme. Vários estudos anteriormente publicados encontraram associação entre a α -Tal e a diminuição do risco de doença cerebrovascular ou AVC (32, 52-54, 56, 67, 69, 100-102, 136). A α -Tal foi incluída neste estudo para confirmação do efeito protetor sugerido na literatura e se esse efeito é mantido na análise multivariada juntamente com outras variáveis genéticas, variáveis laboratoriais e clínicas.

5.5.1.3 SNP no gene codificador de adenilato ciclase 9 (ADCY9)

A determinação genotípica referente ao SNP no gene *ADCY9* (rs2238432) foi realizada por meio de PCR-RFLP (Anexo 3). O polimorfismo *ADCY9* rs2238432 foi associado à ocorrência de AVC pela primeira vez em um estudo que estabeleceu e validou uma rede bayesiana para predição do risco de ocorrência desse evento em indivíduos com anemia falciforme (124). Esse mesmo polimorfismo foi associado à redução do risco de AVC em crianças com anemia falciforme em outro estudo (101). A *ADCY9* é uma enzima ligada a membrana que catalisa a conversão de ATP em AMPc. O tipo 9 é amplamente distribuído e é estimulado pela ativação de receptor beta adrenérgico (142). O gene *ADCY9* possui maior expressão no cérebro e é crítico na sinalização neuronal (101). O polimorfismo *ADCY9* rs2238432 está localizado na região 3' UTR (região não traduzida – *untranslated region*) do gene *ADCY9* e não existe uma explicação acerca de qual seria a influência que esse polimorfismo teria sobre as

funções biológicas do indivíduo que o levaria a ter risco reduzido de ocorrência de AVC. Esse polimorfismo foi incluído neste estudo com intuito de validar a associação previamente descrita na literatura, em uma população de indivíduos com anemia falciforme distinta, pois os dois estudos que encontraram associação foram desenvolvidos com indivíduos provenientes do EUA. Além disso, verificou-se o efeito na análise multivariada juntamente com outras variáveis genéticas, variáveis laboratoriais e clínicas.

5.5.1.4 SNP no gene codificador de anexina A2 (ANXA2)

A determinação genotípica referente ao SNP no gene *ANXA2* (rs11853426) foi realizada por meio de PCR-RFLP (Anexo 4). Assim como *ADCY9* rs2238432, o polimorfismo *ANXA2* rs11853426 foi associado ao aumento do risco de AVC em indivíduos com anemia falciforme no estudo que estabeleceu a rede bayesiana (124) e foi validado posteriormente em outro estudo (101). *ANXA2* é uma proteína ligada à fosfolípide de membrana regulada por cálcio que desempenha um papel na regulação do crescimento celular e em vias de transdução de sinal. Essa proteína funciona como um fator autocrino que aumenta a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea (142). Além disso, *ANXA2* tem um papel regulador na geração de plasmina (143). Não existe uma explicação sobre o impacto que esse polimorfismo teria sobre as funções biológicas do indivíduo que o levaria a ter risco aumentado de ocorrência de AVC. Esse polimorfismo foi incluído neste estudo com intuito de validar a associação previamente descrita na literatura, em uma população de indivíduos com anemia falciforme distinta, pois os dois estudos que encontraram associação foram desenvolvidos com indivíduos provenientes do EUA. Além disso, verificou-se o efeito na análise multivariada juntamente com outras variáveis genéticas, variáveis laboratoriais e clínicas.

5.5.1.5 SNP no gene codificador de ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 1 (ENPPI)

A determinação genotípica referente ao SNP no gene *ENPPI* (rs1044498) foi realizada por meio de PCR-RFLP (Anexo 5). O polimorfismo *ENPPI* rs1044498 foi

associado à ocorrência de AVC em um estudo de associação ampla do genoma (*genome-wide association study* – GWAS) e sequenciamento completo do exoma (*whole-exome sequencing* – WES) realizado nos EUA (134). A glicoproteína transmembrana ENPP1 possui a função de clivar diversas substâncias, incluindo fosfodiéster, ligações de pirofosfato de nucleotídeos e açúcares nucleotídeos, ou seja, um potente gerador de pirofosfato. Mutações no gene *ENPP1* com perda de função resultam em depleção extracelular de pirofosfato. Baixos níveis de pirofosfato causa calcificação arterial. A variante ENPP1 Q173 teria atividade aumentada, tanto no espaço intracelular como no soro. A proteção contra o AVC conferida pela variante Q173 estaria relacionada ao aumento da geração de pirofosfato. Vale ressaltar que a variante Q173 não foi associada a infartos silenciosos e ao DTC de alto risco, ou seja, a variante estaria associada à doença cerebrovascular mais grave (134). Esse polimorfismo foi incluído neste estudo com intuito de validar a associação previamente descrita, pois nenhum outro estudo foi realizado para confirmar os resultados após a primeira descrição da associação. Além disso, verificou-se o efeito na análise multivariada juntamente com outras variáveis genéticas, variáveis laboratoriais e clínicas.

5.5.1.6 SNP no gene codificador de golgina B1 (*GOLGB1*)

A determinação genotípica referente ao SNP no gene *GOLGB1* (rs3732410) foi realizada por meio de PCR-RFLP (Anexo 6). Assim como *ENPP1* rs1044498, o polimorfismo *GOLGB1* rs3732410 foi associado à proteção contra AVC, infartos silenciosos e DTC de alto risco em um estudo de GWAS e WES (134). *GOLGB1* é uma proteína associada ao complexo de golgi. A função melhor caracterizada de *GOLGB1* é ligar-se a proteína de revestimento 1 (*coat protein 1* – COP1), permitindo o seu transporte bidirecional através da pilha de golgi. De acordo com análises *in silico*, a mutação Y1212C (rs3732410) tem efeito deletério na função da proteína. Entretanto, não há hipóteses formuladas e razão aparente que explicaria por que a variante C1212 protegeria contra AVC, infartos silenciosos e DTC de alto risco (134). Esse polimorfismo foi incluído neste estudo com intuito de validar a associação previamente

descrita, pois nenhum outro estudo foi realizado para confirmar os resultados após a primeira descrição da associação.

5.5.1.7 SNP no gene codificador do receptor de interleucina 4 (*IL-4R S503P*)

A determinação genotípica referente a variante *IL-4R S503P* (rs1805015) foi realizada por meio de PCR-RFLP, conforme protocolo descrito previamente (144) (Anexo 7). *IL-4R* é uma proteína transmembrana do tipo I que se liga a *IL-4* ou *IL-13* para regular a produção de IgE ou promover a diferenciação de linfócitos Th2. Uma forma solúvel da proteína pode ser produzida por proteólise da proteína ligada à membrana e essa forma solúvel pode inibir a proliferação celular mediada por *IL-4* e a regulação ascendente de *IL-5* por células T (142). A variante *IL-4R P503* foi associado com predisposição ao AVC isquêmico em grandes vasos em crianças com doença falciforme em dois estudos realizados pelo mesmo grupo de pesquisadores (122, 126). Os autores sugeriram possíveis vias imunomediadas para a ocorrência de AVC. Como o grupo encontrou associação de alguns alelos HLA com o risco de ocorrência do evento, sugeriu-se que o AVC aconteceria através da modulação da expressão de HLA nas células T ativadas dependente de interleucina. Os autores propõe o desenvolvimento de novos estudos para determinar os fatores etiológicos envolvidos na ocorrência de AVC na anemia falciforme (122). O polimorfismo *IL-4R S503P* (rs1805015) foi incluído neste estudo com intuito de validar a associação previamente descrita em uma população diferente de indivíduos com doença falciforme. Além disso, verificou-se o efeito na análise multivariada juntamente com outras variáveis genéticas, variáveis laboratoriais e clínicas.

5.5.1.8 SNPs no gene codificador de interleucina 10 – Haplótipos de *IL-10*

5.5.1.8.1 *IL-10* A-1082G

A determinação genotípica referente ao SNP *IL-10* A-1082G (rs1800896) foi realizada por meio de PCR-RFLP, utilizando protocolo previamente publicado com modificações (145) (Anexo 8).

5.5.1.8.2 *IL-10* C-819T

A determinação genotípica referente ao SNP de *IL-10* C-819T (rs1800871) foi realizada por meio de PCR-RFLP (Anexo 9). Devido ao absoluto desequilíbrio de ligação entre o polimorfismos *IL-10* C-819T e *IL-10* C-592A (146), somente 70 participantes da pesquisa foram genotipados para esse polimorfismo.

5.5.1.8.3 *IL-10* C-592A

A determinação genotípica referente ao SNP *IL-10* C-592A (rs1800872) foi realizada por meio de PCR-RFLP, utilizando protocolo previamente publicado (147) (Anexo 10).

5.5.1.8.4 Determinação dos haplótipos de *IL-10*

Os SNPs na região promotora do gene *IL-10* (A-1082G, *IL-10* C-819T e C-592A) estão em desequilíbrio de ligação e formam haplótipos que influenciam diretamente na expressão da proteína. Os haplótipos GCC, ACC e ATA foram associados com alta, intermediária e baixa produção de *IL-10* em estudos previamente publicados (148, 149). Assim sendo, os participantes da pesquisa tiveram o haplótipo de *IL-10* definido.

A *IL-10* é uma citocina produzida principalmente por monócitos e, em menor quantidade, por linfócitos. *IL-10* possui efeito pleiotrópico na imunoregulação e inflamação. Sabe-se que *IL-10* regula descendentemente a expressão de citocinas de linfócitos Th1, HLA de classe 2 e moléculas coestimulatórias de macrófagos. Além disso, essa citocina aumenta a sobrevivência dos linfócitos B, bem como a proliferação e a

produção de anticorpos (142). Recentemente, dados da *Arabian Gulf University* mostraram uma associação entre níveis reduzidos de IL-10 e a frequência, gravidade e duração de crises vaso oclusivas em indivíduos com doença falciforme (150). Esses dados sugerem que a variação no nível de IL-10 pode modular manifestações clínicas da doença falciforme.

Os haplótipos de *IL-10* já foram anteriormente associados à ocorrência de diversos tipos de doença (151-154). Baseando-se nos conhecimentos atuais sobre a fisiopatologia da doença cerebrovascular (6), aventou-se que fatores que influenciam e modificam a resposta inflamatória poderiam proteger ou predispor pacientes com doença falciforme ao AVC. Por esse motivo o estudo dos haplótipos de *IL-10* foi incluído neste trabalho. Até onde sabemos nenhum outro estudo avaliou a influência desses haplótipos na ocorrência de doença cerebrovascular em indivíduos com doença falciforme.

5.5.1.9 SNP no gene codificador de paraoxonase 1 (*PON1*)

A determinação genotípica referente ao SNP no gene *PON1* (rs662) foi realizada por meio de PCR-RFLP (Anexo 11). A variante *PON1* Q192R (*PON1* rs662) foi identificada como um fator de risco para AVC pelo estudo de WES (134). Essa variante causa uma mudança de aminoácido na posição 192 da enzima (glutamina por arginina), que normalmente tem função de oxonase e esterase. *PON1* Q192R foi anteriormente associada com metabolismo do folato alterado e AVC isquêmico em adultos em diversas populações. Os autores que descreveram a associação consideram fundamental a avaliação em outras coortes independentes de pacientes com anemia falciforme para confirmar a associação da variante *PON1* R192 com risco aumentado de AVC (134). Dessa forma, essa variante foi incluída neste estudo com intuito de validar a associação previamente descrita em uma população diferente de indivíduos com doença falciforme.

5.5.1.10 SNP no gene codificador de tirosina quinase (*TEK*)

A determinação genotípica referente ao SNP em *TEK* (rs489347) foi realizada por meio de PCR-RFLP (Anexo 12). O polimorfismo *TEK* rs489347 foi associado pela primeira vez com aumento do risco de AVC em indivíduos com anemia falciforme pelo estudo que estabeleceu a rede bayesiana (124) e foi validado posteriormente em outro estudo (101). Esse polimorfismo está localizado na região do intron do gene que codifica uma tirosina quinase expressa em células endoteliais e em células progenitoras hematopoéticas. Não existe uma explicação sobre o impacto que esse polimorfismo teria sobre as funções biológicas do indivíduo que o levaria a ter risco aumentado de ocorrência de AVC. Entretanto, o gene *TEK* ajudou a prevenir e recuperar eventos de AVC em indivíduos sem doença falciforme (101). Esse polimorfismo foi incluído neste estudo com intuito de validar a associação previamente descrita na literatura, em uma população de indivíduos com anemia falciforme distinta, pois os dois estudos que encontraram associação foram desenvolvidos com indivíduos provenientes do EUA. Além disso, verificou-se o efeito na análise multivariada juntamente com outras variáveis genéticas, variáveis laboratoriais e clínicas.

5.5.1.11 SNP no gene codificador do receptor do fator de transformação do crescimento beta III (TGFR3)

A determinação genotípica referente ao SNP em *TGFR3* (rs284875) foi realizada por meio de PCR-RFLP (Anexo 13). Assim como *TEK* rs489347, *TGFR3* rs284875 foi associado com aumento do risco de AVC em indivíduos com anemia falciforme pelo estudo que estabeleceu a rede bayesiana (124) e foi validado posteriormente em outro estudo (101). *TGFR3* é um proteoglicano de membrana que funciona como um co-receptor juntamente com outros membros da superfamília de receptores de TGF-beta. Ectodomínio do derramamento produz *TGFR3* solúvel, que pode inibir a sinalização de TGF-beta (142). O AVC foi diretamente associado a variantes de *TGFR3* e indiretamente associado com variantes de *TGFR2*, que possuem papéis essenciais e não redundantes na sinalização de TGF- β . *BMP6* (*Bone morphogenetic protein 6*) faz parte da superfamília TGF- β e também foi associada ao AVC. A associação desses genes com papéis funcionais na sinalização de TGF- β sugere que essa via pode estar envolvida com aumento do risco de AVC (124). Entretanto, o

polimorfismo *TGFFR3* rs284875 está localizado em um intron do gene *TGFFR3* e não se sabe qual modificação que esse polimorfismo causaria sobre as funções biológicas do indivíduo que o levaria a ter risco aumentado de ocorrência de AVC. Sabe-se que mutações no gene *TGFFR3* têm sido associadas com doença cerebrovascular em indivíduos sem doença falciforme (155). Esse polimorfismo foi incluído neste estudo com intuito de validar a associação previamente descrita na literatura, em uma população de indivíduos com anemia falciforme distinta, pois os dois estudos que encontraram associação foram desenvolvidos com indivíduos provenientes do EUA.

5.5.1.12 SNP no gene codificador do fator necrose tumoral alfa (*TNF- α*)

A determinação genotípica referente ao SNP *TNF- α* -308G>A (rs1800629) foi realizada por meio de PCR-RFLP, utilizando protocolo previamente publicado com modificações (145) (Anexo 14). O *TNF- α* é uma citocina pró-inflamatória multifuncional secretada principalmente por macrófagos. Ela pode ligar-se e, então, exercer suas funções através de seus receptores TNFRSF1A/TNFR1 e TNFRSF1B/TNFR2. Essa citocina está envolvida na regulação de vários processos biológicos, incluído proliferação celular, diferenciação celular, metabolismo de lipídios e coagulação (142). O polimorfismo *TNF- α* -308G>A é alvo de muitas pesquisas e já foi associado à ocorrência de várias doenças (156-158). Sabe-se que o alelo mutante está associado a maiores níveis de transcrição do gene *TNF- α* (159) e a maiores níveis da citocina, inclusive em crianças brasileiras com anemia falciforme (133). A literatura científica é controversa quanto o efeito do polimorfismo *TNF- α* -308G>A no risco de ocorrência de doença cerebrovascular em indivíduos com anemia falciforme. Alguns estudos relataram associação do alelo G com aumento do risco de AVC (122, 126), enquanto outros não confirmaram essa relação (56, 101). Esse polimorfismo foi incluído neste estudo com intuito de contribuir para esclarecer qual é o seu real efeito no risco de ocorrência de doença cerebrovascular em indivíduos com doença falciforme. Além disso, verificou-se o efeito na análise multivariada juntamente com outras variáveis genéticas, variáveis laboratoriais e clínicas.

5.5.1.12 SNP no gene codificador da molécula de adesão celular-vascular-1 (VCAM-1)

A determinação genotípica referente ao SNP *VCAM-1* c.1238G>C (rs3783613) foi realizada por meio de PCR-RFLP, conforme protocolo descrito previamente (120) (Anexo 15). VCAM-1 é uma sialoglicoproteína de superfície celular membro da superfamília das imunoglobulinas. Essa molécula é expressa pelo endotélio ativado por citocina e media a adesão entre leucócitos e endotélio (142). A mutação não sinônima *VCAM-1* c.1238G>C leva a uma mudança conservativa de aminoácido na 413ª posição no domínio 5 da molécula de VCAM1. Um estudo anteriormente publicado demonstrou que o alelo C poderia exercer um efeito protetor contra o AVC em indivíduos com anemia falciforme (120). Os autores sugerem que esse polimorfismo poderia influenciar o nível de leucócitos, um conhecido fator de risco para AVC, já que foi encontrada uma associação entre o genótipo CC e menor nível de leucócitos. Entretanto, nenhum outro trabalho foi feito para confirmar esse achado. Esse polimorfismo foi incluído neste estudo com intuito de validar a associação previamente descrita na literatura

5.5.1.13 Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (HPFH)

A detecção molecular de HPFH foi realizada nas crianças com o valor basal de Hb F superior ou igual a 30%, sugerindo o genótipo de duplo heterozigose para S/HPFH (160).

A determinação genotípica referente às deleções HPFH 1, HPFH 2, HPFH 3 no *cluster* do gene beta da globina foi realizada por meio de gap-PCR, utilizando protocolo previamente publicado com modificações (161) (Anexo 16). A identidade de cada deleção foi obtida pela determinação do tamanho do fragmento amplificado em cada reação. Os oligonucleotídeos utilizados geraram a produção de um único fragmento específico na presença da deleção ou um fragmento controle de tamanho diferente na presença do alelo selvagem. A amplificação do alelo selvagem juntamente com a amplificação de um alelo de deleção, indicava que a deleção encontrava-se em heterozigose.

Levando em consideração a maior prevalência da deleção HPFH 2, seguida da deleção HPFH 1, em indivíduos Hb S/HPFH (160), as reações de diagnóstico molecular de HPFH seguiram o fluxo descrito na figura 9.

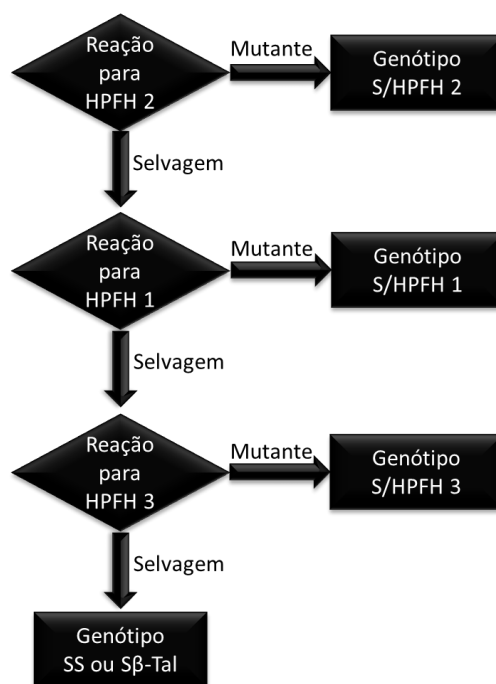


Figura 9 – Fluxo de diagnóstico molecular de HPFH

5.5.1.14 Variantes de Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

A deficiência da enzima G6PD possui herança ligada ao cromossomo X. Homens são hemizigotos para o gene *G6PD*, enquanto as mulheres podem ter expressão gênica normal, ser heterozigotas ou homozigotas para a deficiência. Mulheres heterozigotas constituem mosaico genético, resultante da inativação aleatória de um dos cromossomos X e podem apresentar os mesmos fenômenos fisiopatológicos que homens hemizigotos e mulheres homozigotas para a deficiência (162).

O gene *G6PD* possui cerca de 20 kb, divididas em 13 exons e 12 introns. Codifica 515 aminoácidos (162). O produto do gene selvagem é denominado G6PD B (isoforma B) e é o mais comum no mundo. A G6PD A (isoforma A) é uma variante normal de origem africana, que apresenta cerca de 90% da atividade enzimática, quando comparada com a atividade da G6PD B selvagem (163). Todas as mutações até hoje

identificadas que resultam em deficiência de G6PD afetam a sequência codificadora do gene. Aproximadamente 160 mutações já foram descritas, sendo a grande maioria causada por substituição de única base, resultando em substituição de aminoácido na proteína.

A enzima G6PD catalisa o primeiro passo da via das pentoses fosfato. No eritrócito, a conversão de glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconolactona catalisada pela G6PD é uma fonte muito importante de produção de NADPH (*reduced nicotinamide adenine nucleotide phosphate* – fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido). O NADPH atua reduzindo a glutatona (ou glutatião) e estabilizando a catalase, dois compostos que possuem propriedades antioxidantes nos eritrócitos. Dessa forma, a atividade da enzima G6PD auxilia o eritrócito a suportar o estresse oxidativo. A deficiência da enzima G6PD prejudica a capacidade do eritrócito em remover espécies reativas de oxigênio, levando à lise prematura (164).

O primeiro estudo a descrever associação entre a deficiência de G6PD e a ocorrência de doença cerebrovascular em indivíduos com anemia falciforme foi realizado na França (67). Nessa oportunidade, a deficiência enzimática foi associada ao DTC anormal ($VMM \geq 200$ cm/s). Após a publicação desse trabalho, vários outros estudos foram conduzidos com objetivo de confirmar a associação e esclarecer o papel da deficiência de G6PD na fisiopatologia da doença cerebrovascular. Desde então, a associação foi confirmada por outros estudos, incluindo um trabalho do mesmo grupo Francês (32, 57, 128, 137). Entretanto, outros estudos não confirmaram a associação (56, 68, 101, 165, 166) e o efeito da deficiência de G6PD na ocorrência de doença cerebrovascular permanece controversa (6). Dessa forma, a deficiência de G6PD foi incluída neste estudo com intuito de contribuir para esclarecer qual é o seu real efeito no risco de ocorrência de doença cerebrovascular em indivíduos com doença falciforme.

5.5.1.14.1 Determinação genética da isoforma de G6PD

A isoforma A da G6PD é causada por uma mutação no 376º nucleotídeo do gene que codifica a enzima, resultando em uma troca de aminoácido (Asn376Asp) que causa uma mobilidade eletroforética mais rápida que a isoforma B (167).

A determinação genotípica referente a isoforma de G6PD (A376G; rs1050829) foi realizada por meio de PCR-RFLP, utilizando protocolo previamente publicado com modificações (167) (Anexo 17).

5.5.1.14.2 Variantes G6PD A⁻

5.5.1.14.2.1 G6PD G202A

A variante G6PD A⁻ G202A é a variante mais comum na África sub-sahariana e no Brasil (164, 168). Essa variante de G6PD apresenta cerca de 12% da atividade residual da enzima, quando comparada com a atividade de G6PD B selvagem (167, 169). A determinação genotípica referente à variante G6PD A⁻ G202A (rs1050828) foi realizada por meio de PCR-RFLP, utilizando protocolo previamente publicado com modificações (167) (Anexo 18).

5.5.1.14.2.2 G6PD T968C

A variante de G6PD A⁻ T968C apresenta cerca de 5% da atividade residual da enzima, quando comparado com a atividade de G6PD B selvagem (169). A determinação genotípica referente à variante G6PD A⁻ T968C (rs76723693) foi realizada por meio de PCR-RFLP, utilizando protocolo previamente publicado com modificações (167) (Anexo 19).

5.5.1.14.2.3 G6PD G680T

A variante de G6PD A⁻ G680T apresenta cerca de 10% da atividade residual da enzima, quando comparada com a atividade de G6PD B selvagem. A determinação genotípica referente à variante G6PD A⁻ G680T (rs137852328) foi realizada por meio

de PCR-RFLP, utilizando protocolo previamente publicado com modificações (167) (Anexo 20).

5.5.1.14.2.4 G6PD A542T – Santamaria

A variante de G6PD A⁻ A542T Santamaria apresenta cerca de 2% da atividade residual da enzima, quando comparada com a atividade de G6PD B selvagem (169). A determinação genotípica referente à variante G6PD A⁻ A542T (rs5030872) foi realizada por meio de PCR-RFLP (Anexo 21).

5.5.1.14.3 Variantes G6PD B⁻

5.5.1.14.3.1 G6PD C563T – Mediterranean

A variante de G6PD B⁻ C563T apresenta cerca de 2% da atividade residual da enzima, quando comparada com a atividade de G6PD B selvagem (169). A determinação genotípica referente à variante G6PD B⁻ C563T (rs5030868) foi realizada por meio de PCR-RFLP (Anexo 22).

5.5.1.14.3.2 G6PD G844C – Seattle

A variante de G6PD B⁻ G844C apresenta cerca de 20% da atividade residual da enzima, quando comparado com a atividade de G6PD B selvagem (169). A determinação genotípica referente à variante G6PD B⁻ G844C (rs137852318) foi realizada por meio de PCR-RFLP (Anexo 23).

5.5.1.15 Sequenciamento de DNA para identificação de mutações causadoras de Talassemia Beta

Das 440 crianças originalmente incluídas no estudo (ver seção 5.2), 32 apresentaram o perfil de RFLP heterozigoto para o alelo β^S (protocolo descrito na seção 5.5.1.1) e tiveram o DNA sequenciado para confirmar o genótipo S β -tal e identificar a mutação causadora de talassemia beta. Além disso, as 27 crianças com resultados de testes na triagem neonatal sugestivos de S β -tal também tiveram o DNA sequenciado para confirmação do genótipo e identificação da mutação causadora de talassemia beta.

Dois fragmentos contíguos do gene *HBB* foram sequenciados para identificação das mutações causadoras de talassemia beta heterozigótica associada à Hb S (Figura 10). Para cada amostra, o fragmento 1 (771 pb) foi sequenciado inicialmente e, caso a mutação não fosse identificada, o fragmento 2 (572 pb) era sequenciado. Dessa forma, 100% dos casos tiveram a mutação causadora de talassemia beta identificada. Notar que, até o momento, não há descrição na literatura especializada de mutações patológicas que resultem em beta talassemia nas bases situadas entre os fragmentos 1 e 2, em IVS-II (íntron 2).

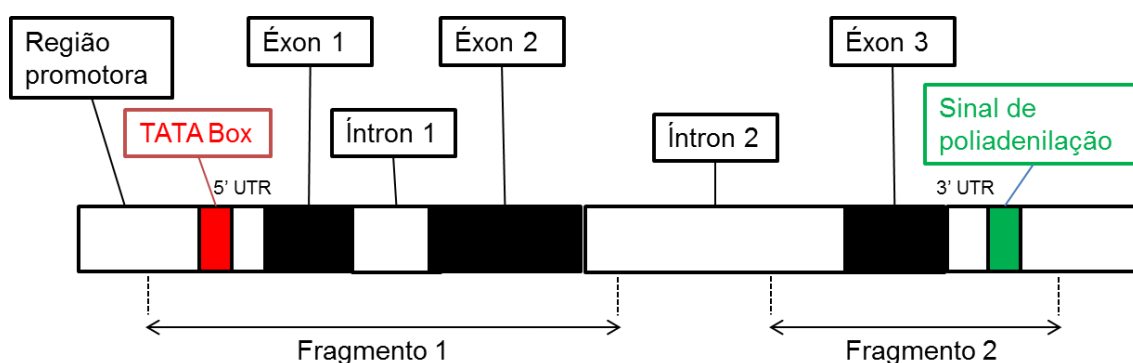


Figura 10 - Ilustração do gene da globina beta (*HBB*), mostrando as regiões sequenciadas para identificação das mutações causadoras de talassemia beta heterozigótica associada à Hb S

5.5.1.15.1 Amplificação do fragmento 1

A amplificação do fragmento 1 do *HBB* foi feita utilizando 250 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 50 μ L contendo tampão para PCR 1X, 2 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'- TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG -3'; reverso: 5'-

TTTCTTGCCATGAGCCTTC -3') e 5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador (Veriti, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) com uma fase inicial a 96°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos a 96°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

5.5.1.15.2 Amplificação do fragmento 2

A amplificação do fragmento 2 do gene *HBB* foi feita utilizando 250 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 50 µL contendo tampão para PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'- TCATGCCTCTTTGCACCATTC -3'; reverso: 5'- GGGAATGTGGGAGGTCAGTG TTTCTTGCCATGAGCCTTC -3') e 5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador (Veriti, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) com uma fase inicial a 96°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos a 96°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

5.5.1.15.3 Purificação do produto do PCR e quantificação do produto purificado

A purificação do produto de PCR foi realizada utilizando kit comercial (kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*, MACHEREY-NAGEL) de acordo com instruções do fabricante.

Para a purificação, 45 µL do produto do PCR foram misturados a 90 µL do tampão NTI. A mistura resultante foi adicionada à coluna "*NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*" contida em tubo coletor de 2 mL. Centrifugou-se a 11.000 x g por 30 segundos e, em seguida, o líquido do tubo coletor foi descartado. Foram adicionados 700 µL do tampão NT3 à coluna. Centrifugou-se a 11.000 x g por 30 segundos e, em seguida, o líquido do tubo coletor foi descartado. O passo anteriormente descrito foi repetido para melhor purificação do DNA. Posteriormente, centrifugou-se a 11.000 x g por 1 minuto para remoção completa do tampão NT3 da coluna. O tubo coletor foi

descartado e a coluna foi incubada a 70°C durante 5 minutos. A coluna foi colocada dentro de um tubo cônico de 1,5 mL e adicionaram-se 30 µL de tampão NE. A coluna foi incubada a temperatura ambiente por 1 minuto e, posteriormente, centrifugada a 11.000 x g por 1 minuto. A coluna foi descartada e o produto da purificação quantificado.

Para quantificação do produto purificado, 4 µL do produto adicionado de 0,5 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (10µg/mL). A eletroforese foi feita a 90 volts, durante 60 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de foto documentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. A quantificação foi obtida através da comparação visual da quantidade de DNA no fragmento purificado com a quantidade de DNA dos fragmentos do padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

5.5.1.15.4 Reação de sequenciamento

As amostras foram sequenciadas utilizando o método de Sanger. Cerca de 20 ng de produto de PCR purificado para cada 100 pb do fragmento a ser sequenciado (exemplo: ~154 ng para o fragmento 1 de 771 pb), 1 µL do oligonucleotídeo sintético (10 pmoles), 3 µL do tampão de diluição (5X Sequencing Buffer; Applied Biosystems; Foster City, CA, USA), 2 µL de BigDye v3.1 (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) e água para completar um volume final de 20 µL. As reações de sequenciamento foram feitas em termociclador (Veriti, Applied Biosystems ou T100 Thermal Cycler, Bio-Rad) com uma fase inicial a 96°C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos a 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. Após o término da reação, as amostras foram mantidas a 4°C.

5.5.1.15.5 Precipitação da reação de sequenciamento

Para precipitação, 90 µL de uma mistura contendo 60 µL de etanol 100%, 3 µL de NaAc 3M e 27 µL de água tipo I foram adicionados ao produto da reação de sequenciamento. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos,

homogeneizando-a por inversão a cada 3 minutos. Centrifugou-se a 2.000 x g por 30 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi descartado por inversão da placa. Em seguida, 150 µL de etanol 70% mantido a -20°C foram adicionados. Posteriormente, a placa foi homogeneizada por inversão 10 vezes e centrifugada a 2.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão e a placa foi centrifugada invertida a 50 x g durante 1 minuto. Foram adicionados 10 µL de formamida (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) em cada poço e a placa homogeneizada vigorosamente por 5 minutos. Posteriormente, a placa foi submetida a temperatura de 95°C por 5 minutos e, em seguida, colocada no gelo até o início da eletroforese capilar.

5.5.1.15.6 Eletroforese capilar

A eletroforese capilar foi realizada em aparelho ABI3130 (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA), utilizando-se polímero POP7 (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) e capilar de 36 ou 48 centímetros (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA).

5.5.1.15.7 Análise dos dados

Os dados foram analisados comparando-se a sequência resultante da reação com a sequência do *HBB* depositada no GenBank (NG_000007), utilizando o programa Codon Code Aligner (CodonCode Corporation, USA). As mutações foram identificadas consultando as mutações listadas por Thein 2013 (170) e as mutações descritas no Globin Gene Server (<http://globin.bx.psu.edu/hemoglobinvar>).

5.5.1.16 Controle de qualidade das reações de biologia molecular

Para confirmar a acurácia dos resultados das análises de PCR/RFLP descritas na Tabela 1, pelo menos 5% das amostras foram aleatorizadas para sequenciamento de DNA. As amostras para sequenciamento foram amplificadas utilizando o mesmo protocolo de amplificação descrito anteriormente (Tabela 1), com exceção de G6PD

A376G e G6PD G202A. O tamanho do fragmento gerado para esses SNPs era muito pequeno para ser sequenciado (90 pb e 109 pb, respectivamente). Dessa forma, um par de oligonucleotídeos sintéticos diferente foi utilizado (direto: 5'-AGGATGATGTATGTAGGTCG - 3'; reverso: 5'- CCCGGACACGCTCATAGAGT – 3'), resultando em um produto de PCR maior (1157 pb). Esse fragmento contém ambos os SNPs. A purificação do produto do PCR, quantificação do produto purificado, a reação de sequenciamento, a precipitação da reação de sequenciamento e a eletroforese capilar foram feitas utilizando os mesmos protocolos descritos anteriormente (seção 5.5.1.16).

Com relação ao diagnóstico molecular de talassemia alfa, 20% das amostras foram testadas novamente para confirmação dos resultados e avaliação da qualidade dos ensaios.

5.5.2 Variáveis laboratoriais

As variáveis laboratoriais estudadas foram: concentração total de hemoglobina (Hb, g/dL), volume corpuscular médio (VCM, fL), hemoglobina corpuscular média (HCM, pg), leucometria total (WBC, $10^9/L$), plaquetometria ($10^9/L$), concentração de hemoglobina fetal (Hb F, %), contagem de reticulócitos (%) e atividade da enzima G6PD (U/g Hb). Os valores de Hb total, VCM, HCM, LEU e PLAQ foram determinados utilizando-se contador eletrônico de células (Coulter T890, Coulter, Hialeah, FL, EUA ou CELL-DYN Ruby, Abbott Laboratories, Santa Clara, CA, USA). A quantificação da porcentagem de Hb F foi realizada utilizando-se o método de imunodifusão radial (HbF Quiplate, Helena Laboratories). A contagem de reticulócitos foi realizada utilizando-se o método de azul de cresil brilhante na microscopia óptica. A atividade da enzima G6PD foi quantificada utilizando método enzimático colorimétrico (descrito na seção 5.5.2.1).

Para a determinação do nível basal das variáveis hematológicas de cada participante do estudo, foi considerada a média de todos os valores após os dois anos de idade, desprezando-se os valores após transfusões sanguíneas (90 dias) ou eventos clínicos significativos (crise de dor, infecção grave, sequestro esplênico agudo, crise

aplástica e síndrome torácica aguda). Nas crianças que entraram em regime de transfusão crônica, que iniciaram tratamento com HU ou que foram submetidos a transplante de medula óssea, foram considerados os valores até a data anterior ao início das respectivas terapêuticas.

Com relação ao valor basal de Hb F, utilizou-se o resultado do último exame após os dois anos de idade, desprezando-se os valores após transfusões sanguíneas (90 dias) ou eventos clínicos significativos (crise de dor, infecção grave, sequestro esplênico agudo, crise aplástica e síndrome torácica aguda). Nas crianças que entraram em regime de transfusão crônica, que iniciaram tratamento com HU ou que foram submetidos a transplante de medula óssea, foi considerado o último exame até a data anterior ao início das respectivas terapêuticas.

5.5.2.1 Quantificação da atividade da enzima G6PD

A atividade da enzima G6PD foi quantificada utilizando-se um método enzimático colorimétrico. Utilizou-se kit comercial para quantificação, de acordo com as instruções do fabricante (*NeoLISA® G6PD*, Interscientific Corporation, Hollywood, FL, USA).

Em duplicata, os controles deficiente, intermediário e normal (5 µL), bem como as amostras (5 µL) dos participantes da pesquisa, foram adicionados nos respectivos poços da microplaca de fundo em “U”. Em seguida, foram adicionados 75 µL do reagente de eluição (R1) em cada um dos poços da microplaca. A microplaca foi incubada a temperatura ambiente, durante 20 minutos, sob agitação contínua. Durante a eluição, o reagente de trabalho (R2) foi reconstituído. Após a eluição, 15 µL do eluato contido na microplaca de fundo “U” foram transferidos para os poços correspondentes na microplaca de fundo chato. Posteriormente, adicionaram-se 75 µL do reagente de trabalho (R2) nos poços da microplaca de fundo chato. Realizou-se imediatamente a leitura da absorbância em 405-410 nanômetros (nm), utilizando leitor de microplacas (TP-READER, THERMO PLATE). A microplaca foi incubada à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Durante a incubação, o reagente de cor (R3) foi preparado. Adicionaram-se 100 µL do reagente de cor em todos os poços da microplaca. Posteriormente, a microplaca foi incubada à temperatura ambiente, durante 10 minutos.

Em seguida, realizou-se leitura da absorbância em 550-570 nm. A microplaca foi incubada à temperatura ambiente, durante 10 minutos, ao abrigo da luz. Após a incubação, uma nova leitura da absorbância em 550-570 nm foi realizada. Pipetagem reversa foi utilizada durante todo o ensaio.

Para obtenção da quantificação da atividade da enzima em U por grama de Hb, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\frac{(\Delta\text{Od amostra } 570 \text{ nm} / \Delta\text{Od controle } 570 \text{ nm/min}) \times \text{valor do controle}}{(\Delta\text{Od amostra } 405 \text{ nm}) / (\Delta\text{Od controle } 405 \text{ nm})}$$

5.5.2 Variáveis clínicas

Os eventos clínicos estudados foram:

- Ataque isquêmico transitório (AIT): presença de sinais neurológicos após interrupção do fluxo vascular, que se resolveram em menos de 24 horas ou 48 horas quando o sistema basilar está envolvido (52);
- Síndrome torácica aguda (STA): aparência radiológica de um novo infiltrado pulmonar acompanhada de febre e dificuldade respiratória (36);
- Pressão sanguínea: média aritmética de todos os valores mensurados, estando o paciente na ausência de eventos clínicos significativos (infecção grave, sequestro esplênico agudo, crise aplástica e síndrome torácica aguda). As pressões sistólicas e diastólicas registradas foram o primeiro e o quinto som de Korotkoff, respectivamente (113);
- Idade: data de término do acompanhamento da coorte subtraída da data de nascimento da criança;
- Gênero: masculino ou feminino.

Para tornar comparáveis as análises com relação à chance de ocorrência e ao número absoluto de eventos clínicos durante o tempo de acompanhamento da criança, foi utilizado o valor referente ao número absoluto de episódios de STA dividido pelo tempo de acompanhamento clínico (data de nascimento subtraída da data da censura da criança).

5.6 Análise estatística

Foram avaliadas as associações das variáveis genéticas, laboratoriais e clínicas com os desfechos estudados, ou seja, AVC isquêmico ou DCV. Com exceção das análises descritivas ou quando foi avaliado o efeito do genótipo na ocorrência dos desfechos, as crianças S β -tal não foram incluídas nas análises estatísticas, pois elas possuem menor risco de ocorrência de AVC (52) e DCV (136). Todo o estudo estatístico foi processado utilizando o programa SPSS, versão 17.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA).

5.6.1 Dados descritivos

Os resultados quantitativos foram expressos como média e um desvio padrão ou erro padrão da média. As prevalências foram expressas pelas porcentagens correspondentes ao item analisado e limites de confiança a 95%.

5.6.2 Análise univariada

A verificação da associação das variáveis nominais com o desfecho (AVC ou DCV) foi realizada utilizando o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando necessário. Para as variáveis contínuas com distribuição normal, o teste t de Student não pareado foi usado para comparação dos grupos. O teste não paramétrico de Mann-Whitney U foi usado para variáveis contínuas com distribuição não-normal. Alternativamente, o teste t de Student não pareado foi usado para comparação das variáveis contínuas, exceto quando a variável apresentou desvio grosseiro da distribuição normal (nesses casos, o teste de Mann-Whitney U foi usado). O teste de Levene foi usado para avaliar a igualdade de variâncias. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para avaliar a distribuição normal ou não-normal das variáveis contínuas.

5.6.3 Análise de sobrevida

A probabilidade cumulativa de AVC isquêmico e DCV foram estimadas usando o método de Kaplan-Meier [função (1-sobrevida)]. O teste de log rank foi usado para comparar os diferentes subgrupos, estratificados em relação às variáveis explicativas estudadas. A data de nascimento determinou a entrada do participante na pesquisa. Início de regime de transfusão crônica, início de tratamento com HU, transplante de medula óssea, morte não relacionada aos desfechos e a última consulta médica (último DTC ou teste de MRA para DCV) sem os desfechos até dezembro de 2014 (fim do estudo) foram razões de cesura.

A regressão de Cox's foi usada para determinar o efeito independente de cada variável explicativa estudada no desfecho. O modelo inicial incluiu todas as variáveis com significância $p \leq 0,20$ na análise univariada. Posteriormente, as variáveis explicativas foram excluídas do modelo, uma por uma, usando a eliminação stepwise ou backward, e o modelo final incluiu somente as variáveis com nível de significância $p \leq 0,1$.

5.7 Aspectos éticos

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE; Anexo 24) foi apresentado ao responsável legal do potencial participante e, quando necessário, à própria criança (crianças com sete anos ou mais). O estudo foi explicado verbalmente pelos pesquisadores envolvidos durante as consultas de rotina do acompanhamento clínico. Concedida a autorização para participação, o responsável legal e, quando necessário, a própria criança assinaram o TCLE, ficando sob sua guarda uma cópia e outra cópia sob a guarda dos pesquisadores.

A consulta aos prontuários foi feita de modo a garantir o sigilo das informações pessoais de cada sujeito da pesquisa. Os pesquisadores envolvidos se comprometeram a utilizar o material biológico e os dados coletados exclusivamente para os fins previstos no projeto de pesquisa.

O projeto de pesquisa referente a este trabalho foi aprovado pela Câmara do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP; anexo 25) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas (CEP-Hemominas; anexo 26). O projeto de pesquisa referente à identificação das mutações causadoras de talassemia beta foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOMINAS (anexo 27)

5.8 Financiamento

O material de laboratório utilizado no desenvolvimento do estudo, tais como, kits de extração de DNA, Kits para quantificação da atividade de G6PD, reagentes para PCR, reagentes para sequenciamento, enzimas de restrição, tubos e ponteiras, foram adquiridos com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação Hemominas e NUPAD. As bolsas de iniciação científica para os estudantes de graduação envolvidos foram financiadas pela FAPEMIG. O pesquisador autor da tese contou com uma bolsa de doutorado concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O orientador é bolsista pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), nível 2. Adicionalmente, a pesquisa recebeu apoio logístico da Central de Projetos do NUPAD e do Centro de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da UFMG.

6. Referências bibliográficas

1. OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man: Johns Hopkins University; 2015 [cited 2015 01/04/2015].
2. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. Lancet. 2010 Dec 11;376(9757):2018-31. PubMed PMID: 21131035.

3. Adams RJ. Big strokes in small persons. *Arch Neurol*. 2007 Nov;64(11):1567-74. PubMed PMID: 17998439. Epub 2007/11/14. eng.
4. Sydenstricker VP. Further observations on sickle cell anemia. *J Am Med Ass*. 1924;83:12-5.
5. Platt OS. Prevention and management of stroke in sickle cell anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:54-7. PubMed PMID: 17124040. Epub 2006/11/25. eng.
6. Connes P, Verlhac S, Bernaudin F. Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2013 May;161(4):484-98. PubMed PMID: 23496688.
7. Ohene-Frempong K. Stroke in sickle cell disease: demographic, clinical, and therapeutic considerations. *Semin Hematol*. 1991 Jul;28(3):213-9. PubMed PMID: 1887247. Epub 1991/07/01. eng.
8. Powars D, Wilson B, Imbus C, Pegelow C, Allen J. The natural history of stroke in sickle cell disease. *The American journal of medicine*. 1978 Sep;65(3):461-71. PubMed PMID: 717414.
9. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med*. 1998 Jul 2;339(1):5-11. PubMed PMID: 9647873. Epub 1998/07/02. eng.
10. Adams RJ, McKie VC, Carl EM, Nichols FT, Perry R, Brock K, et al. Long-term stroke risk in children with sickle cell disease screened with transcranial Doppler. *Ann Neurol*. 1997 Nov;42(5):699-704. PubMed PMID: 9392568. Epub 1997/12/10. eng.
11. Helton KJ, Adams RJ, Kesler KL, Lockhart A, Aygun B, Driscoll C, et al. Magnetic resonance imaging/angiography and transcranial Doppler velocities in sickle cell anemia: results from the SWITCH trial. *Blood*. 2014 Jun 9. PubMed PMID: 24914136.
12. Cherry MG, Greenhalgh J, Osipenko L, Venkatachalam M, Boland A, Dundar Y, et al. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of primary stroke prevention in children with sickle cell disease: a systematic review and economic evaluation. *Health technology assessment*. 2012;16(43):1-129. PubMed PMID: 23140544.
13. Lagunju IA, Brown BJ, Sodeinde OO. Chronic blood transfusion for primary and secondary stroke prevention in Nigerian children with sickle cell disease: a 5-year appraisal. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 Dec;60(12):1940-5. PubMed PMID: 23956197.
14. Adams RJ, Brambilla DJ, Granger S, Gallagher D, Vichinsky E, Abboud MR, et al. Stroke and conversion to high risk in children

- screened with transcranial Doppler ultrasound during the STOP study. *Blood*. 2004 May 15;103(10):3689-94. PubMed PMID: 14751925.
15. Jordan LC, Casella JF, Debaun MR. Prospects for primary stroke prevention in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2012 Jan 9;157(1):14-25. PubMed PMID: 22224940. Epub 2012/01/10. Eng.
 16. Sarnaik SA. Sickle cell diseases: current therapeutic options and potential pitfalls in preventive therapy for transcranial Doppler abnormalities. *Pediatr Radiol*. 2005 Mar;35(3):223-8. PubMed PMID: 15703905. Epub 2005/02/11. eng.
 17. Brambilla DJ, Miller ST, Adams RJ. Intra-individual variation in blood flow velocities in cerebral arteries of children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2007 Sep;49(3):318-22. PubMed PMID: 17243135. Pubmed Central PMCID: 2867598. Epub 2007/01/24. eng.
 18. Rees DC, Dick MC, Height SE, O'Driscoll S, Pohl KR, Goss DE, et al. A simple index using age, hemoglobin, and aspartate transaminase predicts increased intracerebral blood velocity as measured by transcranial Doppler scanning in children with sickle cell anemia. *Pediatrics*. 2008 Jun;121(6):e1628-32. PubMed PMID: 18490379. Epub 2008/05/21. eng.
 19. Ali SB, Moosang M, King L, Knight-Madden J, Reid M. Stroke recurrence in children with sickle cell disease treated with hydroxyurea following first clinical stroke. *Am J Hematol*. 2011 Oct;86(10):846-50. PubMed PMID: 21898530. Epub 2011/09/08. eng.
 20. Lagunju I, Sodeinde O, Brown B, Akinbami F, Adedokun B. Transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell anemia: Clinical and laboratory correlates for elevated blood flow velocities. *Journal of clinical ultrasound : JCU*. 2014 Feb;42(2):89-95. PubMed PMID: 24166013.
 21. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med*. 1996 Jun 27;334(26):1685-90. PubMed PMID: 8637512.
 22. Chou ST, Jackson T, Vege S, Smith-Whitley K, Friedman DF, Westhoff CM. High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood*. 2013 Aug 8;122(6):1062-71. PubMed PMID: 23723452.
 23. Payne KA, Desrosiers MP, Caro JJ, Baladi JF, Lordan N, Proskorovsky I, et al. Clinical and economic burden of infused iron chelation therapy in the United States. *Transfusion*. 2007 Oct;47(10):1820-9. PubMed PMID: 17880607.

24. Fullerton HJ, Gardner M, Adams RJ, Lo LC, Johnston SC. Obstacles to primary stroke prevention in children with sickle cell disease. *Neurology*. 2006 Sep 26;67(6):1098-9. PubMed PMID: 17000992.
25. Eckrich MJ, Wang WC, Yang E, Arbogast PG, Morrow A, Dudley JA, et al. Adherence to transcranial Doppler screening guidelines among children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 Feb;60(2):270-4. PubMed PMID: 22744996.
26. Raphael JL, Shetty PB, Liu H, Mahoney DH, Mueller BU. A critical assessment of transcranial doppler screening rates in a large pediatric sickle cell center: opportunities to improve healthcare quality. *Pediatr Blood Cancer*. 2008 Nov;51(5):647-51. PubMed PMID: 18623200. Epub 2008/07/16. eng.
27. Meier ER, Miller JL. Sickle cell disease in children. *Drugs*. 2012 May 7;72(7):895-906. PubMed PMID: 22519940. Pubmed Central PMCID: 3899685.
28. Buchanan G, Vichinsky E, Krishnamurti L, Shenoy S. Severe sickle cell disease--pathophysiology and therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Jan;16(1 Suppl):S64-7. PubMed PMID: 19819341. Pubmed Central PMCID: 2832723.
29. Rees DC, Gibson JS. Biomarkers in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2012 Feb;156(4):433-45. PubMed PMID: 22122125.
30. Mena F. Stroke in sickle cell anemia patients: a need for multidisciplinary approaches. *Atherosclerosis*. 2013 Aug;229(2):496-503. PubMed PMID: 23746538.
31. Wayne AS, Schoenike SE, Pegelow CH. Financial analysis of chronic transfusion for stroke prevention in sickle cell disease. *Blood*. 2000 Oct 1;96(7):2369-72. PubMed PMID: 11001885.
32. Bernaudin F, Verlhac S, Arnaud C, Kamdem A, Chevret S, Hau I, et al. Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. *Blood*. 2011 Jan 27;117(4):1130-40; quiz 436. PubMed PMID: 21068435. Epub 2010/11/12. eng.
33. Lo W, Zamel K, Ponnappa K, Allen A, Chisolm D, Tang M, et al. The cost of pediatric stroke care and rehabilitation. *Stroke*. 2008 Jan;39(1):161-5. PubMed PMID: 18032740.
34. Serjeant GR. The natural history of sickle cell disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013 Oct;3(10):a011783. PubMed PMID: 23813607.
35. Januario JN. Incidência da doença falciforme em um milhão de nascidos vivos em Minas Gerais (1998-2001). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2002.

36. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2004 Oct 9-15;364(9442):1343-60. PubMed PMID: 15474138.
37. Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2007;29:204-6.
38. Hemominas F. Banco de dados do serviço de captação e cadastro da Fundação Hemominas. In: Hemominas F, editor. 2012.
39. Quinn CT. Sickle cell disease in childhood: from newborn screening through transition to adult medical care. *Pediatric clinics of North America*. 2013 Dec;60(6):1363-81. PubMed PMID: 24237976.
40. Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1999 Apr 1;340(13):1021-30. PubMed PMID: 10099145.
41. Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *TheScientificWorldJournal*. 2008;8:1295-324. PubMed PMID: 19112541.
42. Platt OS. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *The Journal of clinical investigation*. 2000 Aug;106(3):337-8. PubMed PMID: 10930436. Pubmed Central PMCID: 314335.
43. Malowany JI, Butany J. Pathology of sickle cell disease. *Seminars in diagnostic pathology*. 2012 Feb;29(1):49-55. PubMed PMID: 22372205.
44. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood reviews*. 2007 Jan;21(1):37-47. PubMed PMID: 17084951. Pubmed Central PMCID: 2048670.
45. Quinn CT, Rogers ZR, McCavit TL, Buchanan GR. Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. *Blood*. 2010 Apr 29;115(17):3447-52. PubMed PMID: 20194891. Pubmed Central PMCID: 2867259.
46. Roseff SD. Sickle cell disease: a review. *Immunohematology / American Red Cross*. 2009;25(2):67-74. PubMed PMID: 19927623.
47. Steinberg MH, Chui DH, Dover GJ, Sebastiani P, Alsultan A. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? *Blood*. 2014 Jan 23;123(4):481-5. PubMed PMID: 24222332.
48. Naoum PC. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Rev bras hematol hemoter*. 2000;22(1):05-22.
49. Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *TheScientificWorldJournal*. 2009;9:46-67. PubMed PMID: 19151898.
50. Zago MA, Pinto ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2007;29:207-14.

51. Nagel RL. Epistasis and the genetics of human diseases. *Comptes rendus biologiques*. 2005 Jul;328(7):606-15. PubMed PMID: 15992744.
52. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood*. 1998 Jan 1;91(1):288-94. PubMed PMID: 9414296. Epub 1998/02/07. eng.
53. Hsu LL, Miller ST, Wright E, Kutlar A, McKie V, Wang W, et al. Alpha Thalassemia is associated with decreased risk of abnormal transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003 Aug;25(8):622-8. PubMed PMID: 12902915. Epub 2003/08/07. eng.
54. Belisario AR, Rodrigues CV, Martins ML, Silva CM, Viana MB. Coinheritance of alpha-thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. *Hemoglobin*. 2010;34(6):516-29. PubMed PMID: 21077759. Epub 2010/11/17. eng.
55. Filho IL, Leite AC, Moura PG, Ribeiro GS, Cavalcante AC, Azevedo FC, et al. Genetic polymorphisms and cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia from Rio de Janeiro, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*. 2011 Jun;69(3):431-5. PubMed PMID: 21755116. Epub 2011/07/15. eng.
56. Domingos IF, Falcao DA, Hatzlhofer BL, Cunha AF, Santos MN, Albuquerque DM, et al. Influence of the beta haplotype and alpha-thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. *Ann Hematol*. 2014 Feb 4;93(7):1123-9. PubMed PMID: 24493127.
57. Thangarajh M, Yang G, Fuchs D, Ponisio MR, McKinstry RC, Jaju A, et al. Magnetic resonance angiography-defined intracranial vasculopathy is associated with silent cerebral infarcts and glucose-6-phosphate dehydrogenase mutation in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2012 Nov;159(3):352-9. PubMed PMID: 22958163.
58. Abboud MR, Yim E, Musallam KM, Adams RJ. Discontinuing prophylactic transfusions increases the risk of silent brain infarction in children with sickle cell disease: data from STOP II. *Blood*. 2011 Jul 28;118(4):894-8. PubMed PMID: 21633086. Pubmed Central PMCID: 3148169. Epub 2011/06/03. eng.
59. Steen RG, Emudianughe T, Hankins GM, Wynn LW, Wang WC, Xiong X, et al. Brain imaging findings in pediatric patients with sickle cell disease. *Radiology*. 2003 Jul;228(1):216-25. PubMed PMID: 12775848.

60. Broderick J, Talbot GT, Prenger E, Leach A, Brott T. Stroke in children within a major metropolitan area: the surprising importance of intracerebral hemorrhage. *Journal of child neurology*. 1993 Jul;8(3):250-5. PubMed PMID: 8409267.
61. Quinn CT, Rogers ZR, Buchanan GR. Survival of children with sickle cell disease. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4023-7. PubMed PMID: 14764527. Pubmed Central PMCID: 1828870.
62. Balkaran B, Char G, Morris JS, Thomas PW, Serjeant BE, Serjeant GR. Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. *J Pediatr*. 1992 Mar;120(3):360-6. PubMed PMID: 1538280. Epub 1992/03/01. eng.
63. Switzer JA, Hess DC, Nichols FT, Adams RJ. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. *Lancet Neurol*. 2006 Jun;5(6):501-12. PubMed PMID: 16713922. Epub 2006/05/23. eng.
64. Adams RJ, McKie VC, Brambilla D, Carl E, Gallagher D, Nichols FT, et al. Stroke prevention trial in sickle cell anemia. *Control Clin Trials*. 1998 Feb;19(1):110-29. PubMed PMID: 9492971. Epub 1998/03/11. eng.
65. Kwiatkowski JL, Hunter JV, Smith-Whitley K, Katz ML, Shults J, Ohene-Frempong K. Transcranial Doppler ultrasonography in siblings with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2003 Jun;121(6):932-7. PubMed PMID: 12786806. Epub 2003/06/06. eng.
66. Bernaudin F, Verlhac S, Coic L, Lesprit E, Brugieres P, Reinert P. Long-term follow-up of pediatric sickle cell disease patients with abnormal high velocities on transcranial Doppler. *Pediatr Radiol*. 2005 Mar;35(3):242-8. PubMed PMID: 15703901. Epub 2005/02/11. eng.
67. Bernaudin F, Verlhac S, Chevret S, Torres M, Coic L, Arnaud C, et al. 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*. 2008 Nov 15;112(10):4314-7. PubMed PMID: 18772456. Epub 2008/09/06. eng.
68. Rees DC, Lambert C, Cooper E, Bartram J, Goss D, Deane C, et al. Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency is not associated with cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Blood*. 2009 Jul 16;114(3):742-3; author reply 3-4. PubMed PMID: 19608759. Epub 2009/07/18. eng.
69. Cox SE, Makani J, Soka D, L'Esperence V S, Kija E, Dominguez-Salas P, et al. Haptoglobin, alpha-thalassaemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase polymorphisms and risk of abnormal transcranial Doppler among patients with sickle cell anaemia in

Tanzania. *Br J Haematol*. 2014 Feb 21;165(5):699-706. PubMed PMID: 24666344.

70. Silva CM, Giovani P, Viana MB. High reticulocyte count is an independent risk factor for cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Jan;56(1):116-21. PubMed PMID: 20949593. Epub 2010/10/16. eng.

71. Leite AC, de Oliveira RV, de Moura PG, Silva CM, Lobo C. Abnormal transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell disease. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(4):307-10. PubMed PMID: 23049447. Pubmed Central PMCID: 3460401.

72. Moser FG, Miller ST, Bello JA, Pegelow CH, Zimmerman RA, Wang WC, et al. The spectrum of brain MR abnormalities in sickle-cell disease: a report from the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1996 May;17(5):965-72. PubMed PMID: 8733975. Epub 1996/05/01. eng.

73. Kinney TR, Sleeper LA, Wang WC, Zimmerman RA, Pegelow CH, Ohene-Frempong K, et al. Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: a risk factor analysis. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Pediatrics*. 1999 Mar;103(3):640-5. PubMed PMID: 10049969.

74. Pegelow CH, Macklin EA, Moser FG, Wang WC, Bello JA, Miller ST, et al. Longitudinal changes in brain magnetic resonance imaging findings in children with sickle cell disease. *Blood*. 2002 Apr 15;99(8):3014-8. PubMed PMID: 11929794.

75. DeBaun MR, Gordon M, McKinstry RC, Noetzel MJ, White DA, Sarnaik SA, et al. Controlled trial of transfusions for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 2014 Aug 21;371(8):699-710. PubMed PMID: 25140956. Pubmed Central PMCID: 4195437.

76. Webb J, Kwiatkowski JL. Stroke in patients with sickle cell disease. *Expert review of hematology*. 2013 Jun;6(3):301-16. PubMed PMID: 23782084.

77. Hillery CA, Panepinto JA. Pathophysiology of stroke in sickle cell disease. *Microcirculation*. 2004 Mar;11(2):195-208. PubMed PMID: 15280092. Epub 2004/07/29. eng.

78. De Montalembert M, Wang W. Cerebrovascular complications in children with sickle cell disease. *Handbook of clinical neurology*. 2013;113:1937-43. PubMed PMID: 23622417.

79. Platt OS. Preventing stroke in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 2005 Dec 29;353(26):2743-5. PubMed PMID: 16382060. Epub 2005/12/31. eng.

80. Wang WC. The pathophysiology, prevention, and treatment of stroke in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol*. 2007 May;14(3):191-7. PubMed PMID: 17414206. Epub 2007/04/07. eng.

81. Tam DA. Protein C and protein S activity in sickle cell disease and stroke. *Journal of child neurology*. 1997 Jan;12(1):19-21. PubMed PMID: 9010791.
82. Ataga KI, Brittain JE, Desai P, May R, Jones S, Delaney J, et al. Association of coagulation activation with clinical complications in sickle cell disease. *PloS one*. 2012;7(1):e29786. PubMed PMID: 22253781. Pubmed Central PMCID: 3256184.
83. McCavit TL, Xuan L, Zhang S, Flores G, Quinn CT. National trends in incidence rates of hospitalization for stroke in children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 May;60(5):823-7. PubMed PMID: 23151905.
84. McCarville MB, Goodin GS, Fortner G, Li CS, Smeltzer MP, Adams R, et al. Evaluation of a comprehensive transcranial doppler screening program for children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2008 Apr;50(4):818-21. PubMed PMID: 18085672. Epub 2007/12/19. eng.
85. Fullerton HJ, Adams RJ, Zhao S, Johnston SC. Declining stroke rates in Californian children with sickle cell disease. *Blood*. 2004 Jul 15;104(2):336-9. PubMed PMID: 15054044. Epub 2004/04/01. eng.
86. Armstrong-Wells J, Grimes B, Sidney S, Kronish D, Shiboski SC, Adams RJ, et al. Utilization of TCD screening for primary stroke prevention in children with sickle cell disease. *Neurology*. 2009 Apr 14;72(15):1316-21. PubMed PMID: 19365052. Epub 2009/04/15. eng.
87. Enniful-Eghan H, Moore RH, Ichord R, Smith-Whitley K, Kwiatkowski JL. Transcranial Doppler ultrasonography and prophylactic transfusion program is effective in preventing overt stroke in children with sickle cell disease. *J Pediatr*. 2010 Sep;157(3):479-84. PubMed PMID: 20434165. Pubmed Central PMCID: 2931594. Epub 2010/05/04. eng.
88. Adams RJ, Brambilla D. Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2005 Dec 29;353(26):2769-78. PubMed PMID: 16382063. Epub 2005/12/31. eng.
89. Health Nio. NIH ends Transcranial Doppler (TCD) with Transfusions Changing to Hydroxyurea (TWiTCH) clinical trial due to early results: December 22 2014; 2015 [cited 2014]. Available from: <http://www.nih.gov/news/health/nov2014/nhlbi-19.htm>.
90. Pegelow CH, Adams RJ, McKie V, Abboud M, Berman B, Miller ST, et al. Risk of recurrent stroke in patients with sickle cell disease treated with erythrocyte transfusions. *J Pediatr*. 1995 Jun;126(6):896-9. PubMed PMID: 7776091.

91. Scothorn DJ, Price C, Schwartz D, Terrill C, Buchanan GR, Shurney W, et al. Risk of recurrent stroke in children with sickle cell disease receiving blood transfusion therapy for at least five years after initial stroke. *J Pediatr.* 2002 Mar;140(3):348-54. PubMed PMID: 11953734.
92. Cohen AR, Martin MB, Silber JH, Kim HC, Ohene-Frempong K, Schwartz E. A modified transfusion program for prevention of stroke in sickle cell disease. *Blood.* 1992 Apr 1;79(7):1657-61. PubMed PMID: 1558963.
93. Lezcano NE, Odo N, Kutlar A, Brambilla D, Adams RJ. Regular transfusion lowers plasma free hemoglobin in children with sickle-cell disease at risk for stroke. *Stroke.* 2006 Jun;37(6):1424-6. PubMed PMID: 16627796. Epub 2006/04/22. eng.
94. Ware RE, Zimmerman SA, Sylvestre PB, Mortier NA, Davis JS, Treem WR, et al. Prevention of secondary stroke and resolution of transfusional iron overload in children with sickle cell anemia using hydroxyurea and phlebotomy. *J Pediatr.* 2004 Sep;145(3):346-52. PubMed PMID: 15343189. Epub 2004/09/03. eng.
95. Ware RE, Helms RW. Stroke With Transfusions Changing to Hydroxyurea (SWiTCH). *Blood.* 2012 Apr 26;119(17):3925-32. PubMed PMID: 22318199. Pubmed Central PMCID: 3350359. Epub 2012/02/10. Eng.
96. Lefevre N, Dufour D, Gulbis B, Le PQ, Heijmans C, Ferster A. Use of hydroxyurea in prevention of stroke in children with sickle cell disease. *Blood.* 2008 Jan 15;111(2):963-4; author reply 4. PubMed PMID: 18182580. Epub 2008/01/10. eng.
97. Driscoll MC, Hurlet A, Styles L, McKie V, Files B, Olivieri N, et al. Stroke risk in siblings with sickle cell anemia. *Blood.* 2003 Mar 15;101(6):2401-4. PubMed PMID: 12609963. Epub 2003/03/01. eng.
98. Hoppe C, Klitz W, Noble J, Vigil L, Vichinsky E, Styles L. Distinct HLA associations by stroke subtype in children with sickle cell anemia. *Blood.* 2003 Apr 1;101(7):2865-9. PubMed PMID: 12517810. Epub 2003/01/09. eng.
99. Chang Milbauer L, Wei P, Enestein J, Jiang A, Hillery CA, Scott JP, et al. Genetic endothelial systems biology of sickle stroke risk. *Blood.* 2008 Apr 1;111(7):3872-9. PubMed PMID: 18156497. Pubmed Central PMCID: 2275038. Epub 2007/12/25. eng.
100. Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood.* 1995 Jul 15;86(2):776-83. PubMed PMID: 7606007. Epub 1995/07/15. eng.
101. Flanagan JM, Frohlich DM, Howard TA, Schultz WH, Driscoll C, Nagasubramanian R, et al. Genetic predictors for stroke in children

with sickle cell anemia. *Blood*. 2011 Jun 16;117(24):6681-4. PubMed PMID: 21515823. Pubmed Central PMCID: 3123027. Epub 2011/04/26. eng.

102. Neonato MG, Guilloud-Bataille M, Beauvais P, Begue P, Belloy M, Benkerrou M, et al. Acute clinical events in 299 homozygous sickle cell patients living in France. French Study Group on Sickle Cell Disease. *Eur J Haematol*. 2000 Sep;65(3):155-64. PubMed PMID: 11007050. Epub 2000/09/28. eng.

103. Vicari P, Silva GS, Nogutti MA, Neto FM, dos Santos NJ, Massaro AR, et al. Absence of association between TNF-alpha polymorphism and cerebral large-vessel abnormalities in adults with sickle cell anemia. *Acta Haematol*. 2011;125(3):141-4. PubMed PMID: 21160173. Epub 2010/12/17. eng.

104. Hyacinth HI, Gee BE, Adamkiewicz TV, Adams RJ, Kutlar A, Stiles JK, et al. Plasma BDNF and PDGF-AA levels are associated with high TCD velocity and stroke in children with sickle cell anemia. *Cytokine*. 2012 Oct;60(1):302-8. PubMed PMID: 22704695. Pubmed Central PMCID: 3429653.

105. Wierenga KJ, Serjeant BE, Serjeant GR. Cerebrovascular complications and parvovirus infection in homozygous sickle cell disease. *J Pediatr*. 2001 Sep;139(3):438-42. PubMed PMID: 11562626.

106. Kirkham FJ, Hewes DK, Prengler M, Wade A, Lane R, Evans JP. Nocturnal hypoxaemia and central-nervous-system events in sickle-cell disease. *Lancet*. 2001 May 26;357(9269):1656-9. PubMed PMID: 11425370. Epub 2001/06/27. eng.

107. Powars DR. Sickle cell anemia: beta s-gene-cluster haplotypes as prognostic indicators of vital organ failure. *Semin Hematol*. 1991 Jul;28(3):202-8. PubMed PMID: 1887245. Epub 1991/07/01. eng.

108. Adams R, McKie V, Nichols F, Carl E, Zhang DL, McKie K, et al. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1992 Feb 27;326(9):605-10. PubMed PMID: 1734251. Epub 1992/02/27. eng.

109. Rodgers GP, Walker EC, Podgor MJ. Is "relative" hypertension a risk factor for vaso-occlusive complications in sickle cell disease? *Am J Med Sci*. 1993 Mar;305(3):150-6. PubMed PMID: 8447334. Epub 1993/03/01. eng.

110. de Montalembert M, Beauvais P, Bachir D, Galacteros F, Girot R. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease. Risk factors and blood transfusion influence. French Study Group on Sickle Cell Disease. *European journal of pediatrics*. 1993 Mar;152(3):201-4. PubMed PMID: 8444244.

111. Adams RJ, Kutlar A, McKie V, Carl E, Nichols FT, Liu JC, et al. Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 1994 Apr;45(4):279-82. PubMed PMID: 8178798.
112. Houston PE, Rana S, Sekhsaria S, Perlin E, Kim KS, Castro OL. Homocysteine in sickle cell disease: relationship to stroke. *The American journal of medicine.* 1997 Sep;103(3):192-6. PubMed PMID: 9316551.
113. Pegelow CH, Colangelo L, Steinberg M, Wright EC, Smith J, Phillips G, et al. Natural history of blood pressure in sickle cell disease: risks for stroke and death associated with relative hypertension in sickle cell anemia. *The American journal of medicine.* 1997 Feb;102(2):171-7. PubMed PMID: 9217567. Epub 1997/02/01. eng.
114. Kahn MJ, Scher C, Rozans M, Michaels RK, Leissinger C, Krause J. Factor V Leiden is not responsible for stroke in patients with sickling disorders and is uncommon in African Americans with sickle cell disease. *Am J Hematol.* 1997 Jan;54(1):12-5. PubMed PMID: 8980255.
115. Styles LA, Hoppe C, Klitz W, Vichinsky E, Lubin B, Trachtenberg E. Evidence for HLA-related susceptibility for stroke in children with sickle cell disease. *Blood.* 2000 Jun 1;95(11):3562-7. PubMed PMID: 10828044. Epub 2000/05/29. eng.
116. Hoppe C, Cheng S, Grow M, Silbergleit A, Klitz W, Trachtenberg E, et al. A novel multilocus genotyping assay to identify genetic predictors of stroke in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2001 Sep;114(3):718-20. PubMed PMID: 11553004. Epub 2001/09/13. eng.
117. Tang DC, Prauner R, Liu W, Kim KH, Hirsch RP, Driscoll MC, et al. Polymorphisms within the angiotensinogen gene (GT-repeat) and the risk of stroke in pediatric patients with sickle cell disease: a case-control study. *Am J Hematol.* 2001 Nov;68(3):164-9. PubMed PMID: 11754397. Epub 2002/01/05. eng.
118. Sarnaik SA, Ballas SK. Molecular characteristics of pediatric patients with sickle cell anemia and stroke. *Am J Hematol.* 2001 Jul;67(3):179-82. PubMed PMID: 11391715. Epub 2001/06/08. eng.
119. Miller ST, Macklin EA, Pegelow CH, Kinney TR, Sleeper LA, Bello JA, et al. Silent infarction as a risk factor for overt stroke in children with sickle cell anemia: a report from the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *J Pediatr.* 2001 Sep;139(3):385-90. PubMed PMID: 11562618. Epub 2001/09/20. eng.
120. Taylor JGt, Tang DC, Savage SA, Leitman SF, Heller SI, Serjeant GR, et al. Variants in the VCAM1 gene and risk for symptomatic stroke in sickle cell disease. *Blood.* 2002 Dec 15;100(13):4303-9. PubMed PMID: 12393616. Epub 2002/10/24. eng.

121. Taylor JG, Tang D, Foster CB, Serjeant GR, Rodgers GP, Chanock SJ. Patterns of low-affinity immunoglobulin receptor polymorphisms in stroke and homozygous sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2002 Feb;69(2):109-14. PubMed PMID: 11835346. Epub 2002/02/09. eng.
122. Hoppe C, Klitz W, Cheng S, Apple R, Steiner L, Robles L, et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood.* 2004 Mar 15;103(6):2391-6. PubMed PMID: 14615367. Epub 2003/11/15. eng.
123. Romana M, Diara JP, Doumbo L, Muralitharan S, Ramasawmy R, Keclard L, et al. Angiotensinogen gene associated polymorphisms and risk of stroke in sickle cell anemia: Additional data supporting an association. *Am J Hematol.* 2004 Jul;76(3):310-1. PubMed PMID: 15224377. Epub 2004/06/30. eng.
124. Sebastiani P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT, Steinberg MH. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. *Nat Genet.* 2005 Apr;37(4):435-40. PubMed PMID: 15778708. Pubmed Central PMCID: 2896308. Epub 2005/03/22. eng.
125. Kwiatkowski JL, Granger S, Brambilla DJ, Brown RC, Miller ST, Adams RJ. Elevated blood flow velocity in the anterior cerebral artery and stroke risk in sickle cell disease: extended analysis from the STOP trial. *Br J Haematol.* 2006 Aug;134(3):333-9. PubMed PMID: 16848777. Epub 2006/07/20. eng.
126. Hoppe C, Klitz W, D'Harlingue K, Cheng S, Grow M, Steiner L, et al. Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Stroke.* 2007 Aug;38(8):2241-6. PubMed PMID: 17600229. Epub 2007/06/30. eng.
127. Quinn CT, Sargent JW. Daytime steady-state haemoglobin desaturation is a risk factor for overt stroke in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2008 Feb;140(3):336-9. PubMed PMID: 18042265. Pubmed Central PMCID: 2562641. Epub 2007/11/29. eng.
128. Hellani A, Al-Akoum S, Abu-Amero KK. G6PD Mediterranean S188F codon mutation is common among Saudi sickle cell patients and increases the risk of stroke. *Genetic testing and molecular biomarkers.* 2009 Aug;13(4):449-52. PubMed PMID: 19594365. Epub 2009/07/15. eng.
129. Quinn CT, Variste J, Dowling MM. Haemoglobin oxygen saturation is a determinant of cerebral artery blood flow velocity in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2009 May;145(4):500-5. PubMed PMID: 19344400. Pubmed Central PMCID: 2737449. Epub 2009/04/07. eng.

130. Makani J, Kirkham FJ, Komba A, Ajala-Agbo T, Otieno G, Fegan G, et al. Risk factors for high cerebral blood flow velocity and death in Kenyan children with Sickle Cell Anaemia: role of haemoglobin oxygen saturation and febrile illness. *Br J Haematol*. 2009 May;145(4):529-32. PubMed PMID: 19344425. Pubmed Central PMCID: 3001030. Epub 2009/04/07. eng.
131. Pavlakis SG, Rees RC, Huang X, Brown RC, Casella JF, Iyer RV, et al. TCD velocitiesTranscranial doppler ultrasonography (TCD) in infants with sickle cell anemia: baseline data from the BABY HUG trial. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Feb;54(2):256-9. PubMed PMID: 19813252. Pubmed Central PMCID: 2794994. Epub 2009/10/09. eng.
132. Deane CR, Goss D, Bartram J, Pohl KR, Height SE, Sibtain N, et al. Extracranial internal carotid arterial disease in children with sickle cell anemia. *Haematologica*. 2010 Aug;95(8):1287-92. PubMed PMID: 20220066. Pubmed Central PMCID: 2913076.
133. Cajado C, Cerqueira BA, Couto FD, Moura-Neto JP, Vilas-Boas W, Dorea MJ, et al. TNF-alpha and IL-8: serum levels and gene polymorphisms (-308G>A and -251A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. *Cytokine*. 2011 Nov;56(2):312-7. PubMed PMID: 21802960.
134. Flanagan JM, Sheehan V, Linder H, Howard TA, Wang YD, Hoppe CC, et al. Genetic mapping and exome sequencing identify 2 mutations associated with stroke protection in pediatric patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2013 Apr 18;121(16):3237-45. PubMed PMID: 23422753. Pubmed Central PMCID: 3630835.
135. Meier ER, Wright EC, Miller JL. Reticulocytosis and anemia are associated with an increased risk of death and stroke in the newborn cohort of the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Am J Hematol*. 2014 Sep;89(9):904-6. PubMed PMID: 24891147. Pubmed Central PMCID: 4134755.
136. Belisario AR, Nogueira FL, Rodrigues RS, Toledo NE, Cattabriga AL, Velloso-Rodrigues C, et al. 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*. 2015 Aug 27;54:44-50. PubMed PMID: 25175566.
137. Joly P, Garnier; N, Kebaili3; K, Renoux; C, Dony3; A, Cheikh3; N, et al. G6PD deficiency and absence of alpha-thalassemia increase the risk for cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia. *European Journal Of Haematology*. 2015.
138. Meier ER, Fasano RM, Estrada M, He J, Luban NL, McCarter R. Early Reticulocytosis and Anemia Are Associated with Abnormal and

Conditional Transcranial Doppler Velocities in Children with Sickle Cell Anemia. *J Pediatr*. 2015 Nov 17. PubMed PMID: 26593107.

139. Kwiatkowski JL, Zimmerman R, Greenbaum B, Ohene-Frempong K. Stroke and elevated blood flow velocity in the anterior cerebral artery in sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004 May;26(5):323-6. PubMed PMID: 15111788. Epub 2004/04/28. eng.

140. Lobo CL, Cancado RD, Leite AC, Dos Anjos AC, Pinto AC, Matta AP, et al. Brazilian Guidelines for transcranial doppler in children and adolescents with sickle cell disease. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011;33(1):43-8. PubMed PMID: 23284243. Pubmed Central PMCID: 3521435.

141. Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood*. 2001 Jul 1;98(1):250-1. PubMed PMID: 11439976.

142. Pruitt KD, Brown GR, Hiatt SM, Thibaud-Nissen F, Astashyn A, Ermolaeva O, et al. RefSeq: an update on mammalian reference sequences. *Nucleic acids research*. 2014 Jan;42(Database issue):D756-63. PubMed PMID: 24259432. Pubmed Central PMCID: 3965018.

143. Ling Q, Jacovina AT, Deora A, Febbraio M, Simantov R, Silverstein RL, et al. Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 2004 Jan;113(1):38-48. PubMed PMID: 14702107. Pubmed Central PMCID: 300771.

144. Wrensch M, Wiencke JK, Wiemels J, Miike R, Patoka J, Moghadassi M, et al. Serum IgE, tumor epidermal growth factor receptor expression, and inherited polymorphisms associated with glioma survival. *Cancer Res*. 2006 Apr 15;66(8):4531-41. PubMed PMID: 16618782. Epub 2006/04/19. eng.

145. Johnson VJ, Yucesoy B, Luster MI. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology. *Cytokine*. 2004 Sep 21;27(6):135-41. PubMed PMID: 15304242.

146. Shin HD, Park BL, Kim LH, Jung JH, Kim JY, Yoon JH, et al. Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *Human molecular genetics*. 2003 Apr 15;12(8):901-6. PubMed PMID: 12668613.

147. Hoebee B, Bont L, Rietveld E, van Oosten M, Hodemaekers HM, Nagelkerke NJ, et al. Influence of promoter variants of interleukin-10, interleukin-9, and tumor necrosis factor-alpha genes on respiratory syncytial virus bronchiolitis. *The Journal of infectious diseases*. 2004 Jan 15;189(2):239-47. PubMed PMID: 14722888.

148. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region

determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999 Jun;42(6):1101-8. PubMed PMID: 10366102.

149. Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology.* 1999 Aug;30(2):526-30. PubMed PMID: 10421663.

150. Sarray S, Saleh LR, Lisa Saldanha F, Al-Habboubi HH, Mahdi N, Almawi WY. Serum IL-6, IL-10, and TNFalpha levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. *Cytokine.* 2015 Mar;72(1):43-7. PubMed PMID: 25569375.

151. Zheng XY, Guan WJ, Mao C, Chen HF, Ding H, Zheng JP, et al. Interleukin-10 promoter 1082/-819/-592 polymorphisms are associated with asthma susceptibility in Asians and atopic asthma: a meta-analysis. *Lung.* 2014 Feb;192(1):65-73. PubMed PMID: 24162871.

152. Qin B, Wang J, Liang Y, Yang Z, Zhong R. The association between TNF-alpha, IL-10 gene polymorphisms and primary Sjogren's syndrome: a meta-analysis and systemic review. *PloS one.* 2013;8(5):e63401. PubMed PMID: 23723980. Pubmed Central PMCID: 3661073.

153. Opdal SH. IL-10 gene polymorphisms in infectious disease and SIDS. *FEMS immunology and medical microbiology.* 2004 Sep 1;42(1):48-52. PubMed PMID: 15325397.

154. Chaves D, Belisario A, Castro G, Santoro M, Rodrigues C. Analysis of cytokine genes polymorphism as markers for inhibitor development in haemophilia A. *International journal of immunogenetics.* 2010 Apr;37(2):79-82. PubMed PMID: 20082647.

155. Santiago-Sim T, Mathew-Joseph S, Pannu H, Milewicz DM, Seidman CE, Seidman JG, et al. Sequencing of TGF-beta pathway genes in familial cases of intracranial aneurysm. *Stroke.* 2009 May;40(5):1604-11. PubMed PMID: 19299629. Pubmed Central PMCID: 2678560.

156. Roszak A, Misztal M, Sowinska A, Jagodzinski PP. TNF-alpha -308 G/A as a Risk Marker of Cervical Cancer Progression in the Polish Population. *Molecular diagnosis & therapy.* 2015 Jan 23. PubMed PMID: 25614219.

157. Ahir S, Mania-Pramanik J, Chavan V, Kerkar S, Samant-Mavani P, Nanavati R, et al. Genetic variation in the promoter region of pro-inflammatory cytokine TNF-alpha in perinatal HIV transmission from Mumbai, India. *Cytokine.* 2014 Dec 23;72(1):25-30. PubMed PMID: 25544182.

158. Li F, Gao J, Sokolove J, Xu J, Zheng J, Zhu K, et al. Polymorphisms in the TNF-alpha, TNFR1 gene and risk of rheumatoid arthritis in Chinese Han population. *International journal of immunogenetics*. 2014 Dec;41(6):499-502. PubMed PMID: 25263964.
159. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Molecular immunology*. 1997 Apr;34(5):391-9. PubMed PMID: 9293772.
160. Ngo DA, Aygun B, Akinsheye I, Hankins JS, Bhan I, Luo HY, et al. Fetal haemoglobin levels and haematological characteristics of compound heterozygotes for haemoglobin S and deletional hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Br J Haematol*. 2011 Oct 24;156(2):259-64. PubMed PMID: 22017641. Epub 2011/10/25. Eng.
161. Craig JE, Barnetson RA, Prior J, Raven JL, Thein SL. Rapid detection of deletions causing delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. *Blood*. 1994 Mar 15;83(6):1673-82. PubMed PMID: 7510147.
162. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*. 2008 Jan 5;371(9606):64-74. PubMed PMID: 18177777. Epub 2008/01/08.
163. Wolfe L, Manley PE. Disorders of erythrocyte metabolism including porphyria. In: Arceci RJ, Hann IM, Smith OP, editors. *Pediatric Hematology*. 3rd Edition: Wiley-Blackwell; 2006. p. 840.
164. Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, Hall SA, Beutler E. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cells Mol Dis*. 2009 May-Jun;42(3):267-78. PubMed PMID: 19233695.
165. Miller ST, Milton J, Steinberg MH. G6PD deficiency and stroke in the CSSCD. *Am J Hematol*. 2011 Mar;86(3):331. PubMed PMID: 21328436.
166. Benkerrou M, Alberti C, Couque N, Haouari Z, Ba A, Missud F, et al. Impact of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on sickle cell anaemia expression in infancy and early childhood: a prospective study. *Br J Haematol*. 2013 Dec;163(5):646-54. PubMed PMID: 24117340.
167. Beutler E, Kuhl W, Vives-Corrons JL, Prchal JT. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase A. *Blood*. 1989 Nov 15;74(7):2550-5. PubMed PMID: 2572288. Epub 1989/11/15. eng.
168. Saad ST, Salles TS, Carvalho MH, Costa FF. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brazil. *Hum Hered*. 1997 Jan-Feb;47(1):17-21. PubMed PMID: 9017974. Epub 1997/01/01. eng.

169. Rodrigues MO, Freire AP, Martins G, Pereira J, Martins MD, Monteiro C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Portugal: biochemical and mutational profiles, heterogeneity, and haplotype association. *Blood Cells Mol Dis.* 2002 Mar-Apr;28(2):249-59. PubMed PMID: 12064920. Epub 2002/06/18.
170. Thein SL. The molecular basis of beta-thalassemia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2013 May;3(5):a011700. PubMed PMID: 23637309.

7. Artigo 1 – Publicado no volume 54 do periódico *Blood cells, molecules, and diseases* (DOI: 10.1016/j.bcmed.2014.08.001.)

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

Belisário, André Rolim ^{a,b*}; Nogueira, Frederico Lisboa ^b; Rodrigues, Rahyssa Sales ^c; Toledo, Nayara Evelin ^c; Cattabriga, Ana Luiza Moreira ^c; Velloso-Rodrigues, Cibele ^d; Duarte, Filipe Otávio Chaves ^b; Silva, Célia Maria ^c; and Viana, Marcos Borato ^b

^a Centro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais, Fundação Hemominas, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil

^b Faculdade de Medicina/NUPAD, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

^c Serviço de Pesquisa, Fundação Hemominas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

^d Departamento Básico – Área de Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil

***Correspondence to:** André Rolim Belisário, Biological Tissue Center, Hemominas Foundation; Rua das Goiabeiras; Lagoa Santa, Brazil; Zip Code 33400-000. Phone: +55 (31) 3268.0548. Fax: 55 (31) 3248.9579. E-mail: andrebelisario@yahoo.com.br

Abstract

Cerebrovascular disease (CVD) is a severe complication associated with sickle cell anemia. Abnormal transcranial Doppler (TCD) identifies some children at high risk, but other markers would be helpful. This cohort study was aimed at evaluating the effects of genetic biomarkers on the risk of developing CVD in children from Minas Gerais, Brazil. Clinical and hematological data were retrieved from children's records. Outcomes studied were overt ischemic stroke and CVD (overt ischemic stroke, transient ischemic attack, abnormal TCD, or abnormal cerebral images). Out of 411 children, 386 (93.9%) had SS genotype, 23 (5.6%) had S β^0 -thal and two had severe S β^+ -thal (0.5%). Frequency of CVD was lower in S β -thal group ($p=0.05$). No effect of VCAM-1 polymorphism on stroke or CVD risks was detected. Cumulative incidence of stroke was significantly higher for children with TNF- α A allele ($p=0.02$) and lower for children with *HBA* deletion ($p=0.02$). However, no association between CVD and TNF- α -308G>A was found. CVD cumulative incidence was significantly lower for children with *HBA* deletion ($p=0.004$). This study found no association between VCAM1 c.1238G>C and stroke. An association between stroke and TNF- α -308A allele has been suggested. Our results have confirmed the protective role of *HBA* deletion against stroke and CVD.

Key words: Sickle cell anemia, Stroke, VCAM-1, TNF-alpha, Alpha-thalassemia

Introduction

Sickle cell anemia (SCA) is a monogenic disorder caused by a homozygous mutation in the β -globin gene (*HBB*:c.20A>T, p.E6V), resulting in early death and morbidity (1). Cerebrovascular complications are very common in patients suffering from SCA. Cerebrovascular disease (CVD) include overt stroke, silent infarcts, transient ischemic attack (TIA), abnormal magnetic resonance angiography (MRA), and abnormal transcranial Doppler (TCD). Overt stroke is the most catastrophic of them and occurs in 11% of patients by the age of twenty (2). CVD affect almost one-half of SCA patients by the age of fourteen (3).

Currently, TCD ultrasonography is the only clinical useful prognostic tool available to detect increased risk of stroke in children with SCA. Prophylactic chronic erythrocyte transfusion therapy reduces in 92% the risk of occurrence of stroke in SCA patients at high risk (4). The TCD test is very sensitive but only moderately specific because 60% of untreated children at high risk of experiencing stroke, as indicated by TCD, did not experience any episode of stroke (5); therefore, it would have been harmful for these subjects to be exposed to the side effects of chronic transfusion therapy. It has been estimated that to prevent the occurrence of one stroke, seven children would receive chronic transfusion therapy (6). Moreover, there are other limitations associated with TCD screening: stroke can occur in patients showing normal TCD results (5, 7); there can be relatively large intra-subject variability (8); access to TCD and chronic transfusion therapy may be limited (9, 10), especially in developing countries (10); adherence to screening programs can be a crucial problem (11, 12); family members and physicians may be reluctant to accept chronic transfusion therapy. Because of these shortcomings, it is necessary to identify biomarkers that can assess the risk of developing stroke with high specificity.

Results obtained using several genetic biomarkers have been reported in literature. However, some of these results are controversial and therefore require adequate validation (13). For instance, literature reports indicated that homozygous polymorphic -308G allele (c.-488g; *rs1800629*) in the promoter region of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene is associated with increased risk of stroke (14, 15); whereas, another study reported no such association (16). Previously, α -globin gene (*HBA*) deletion has confirmed protective effect against stroke and CVD (2, 3, 16-20), but findings from two recent studies indicated no such association (21, 22).

Previous evidence has demonstrated that the vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) gene coding single-nucleotide polymorphism (SNP) c.1238G>C (*rs3783613*) may be protective against stroke in SCA (23). However, no further research was done to confirm this finding. The present study evaluated the influences of TNF- α -308G>A and VCAM1 c.1238G>C polymorphisms, *HBA* deletion status, and sickle cell genotype on the risk of developing CVD in the Minas Gerais state SCA newborn cohort, Brazil.

Material and Methods

Study Design

This is a retrospective cohort study involving children with SCA. Between January 1999 and December 2008, the Newborn Screening Program diagnosed 1,066 children with HbFS profile in the state of Minas Gerais located at the southeastern part of Brazil. Out of 1,066 children, 554 children were scheduled to have their first clinical appointment in the outpatient care unit of Hemominas Foundation, which is situated in the state capital Belo Horizonte. Among these 554 children, 49 children died before the study began (March 2011); 32 children were transferred to another outpatient care unit, and one child was subjected to private practice follow-up. The remaining 472 children were eligible for participation. Enrollment was closed in July 2013. Out of these 472 children, parents of five children did not allow their children to participate in this study, four children were transferred to another outpatient care unit after the beginning of the study, four children died during the study, and 38 children could not be reached for blood collection during the study program. Eight children with a double heterozygous mutation for HbS and hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) and two children who were proven to be S β^+ -thalassemia (S β^+ -thal) positive and who had a steady state relative concentration of HbA above 7% were also excluded from this study. Therefore, the study population consisted of 411 children with genotypes SS, S β^0 -thalassemia (S β^0 -thal) or S β^+ -thal type I [less than 7% of HbA; clinical and hematological features similar to S β^0 -thal (24)]. In a previous study, the prevalence of the Central African Republic, Benin, Arab-Indian and atypical β^S haplotype alleles in 208 of these children (only those with homozygous β^S

allele) was 0.57, 0.42, 0.005, and 0.01, respectively. No association between haplotypes and CVD was detected (25).

The study protocol was approved by the Institutional Review Board. Written informed consent was obtained from parents or guardian of every child in accordance with the rule set up by the “Declaration of Helsinki” guidelines and children’s assent was obtained, when appropriate.

Molecular Analysis

Genomic DNA extraction from blood samples was carried out by using a commercial kit (QIA amp, DNA Blood Mini Kit; Qiagen; Hilden, Germany). VCAM-1 c.1238G>C (*rs3783613*) and TNF- α -308G>A (*rs1800629*) polymorphisms were determined by PCR/RFLP as described previously (23, 26). Furthermore, at least 5% of the samples were randomly selected for DNA sequencing to confirm the reproducibility of PCR/RFLP results. DNA sequencing was done in ABI Prism 3130 Analyzer (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). Presence of β^S allele was confirmed by PCR/RFLP analysis as described previously (25). Heterozygous children for β^S allele had *HBB* sequenced to confirm the presence of S β^0 -thal or S β^+ -thal genotype. Molecular analyses were performed on children with steady state HbF concentration equal or greater than 30%, suggesting HbS/HPFH genotype (27). HPFH 1, 2 e 3 deletions were detected by gap-PCR as described previously (28). Detection of *HBA* more frequent deletions ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--_{SEA}$, $--_{FIL}$, $--_{MED}$, $-(\alpha)^{20.5}$, and $--_{THAI}$) was carried out by multiplex gap PCR as described previously (29); the primers’ annealing temperature was increased to 62°C. For further confirmation, 20% of the samples were retested for *HBA* deletions to validate the results.

Clinical and Hematological Data

Clinical and hematological information regarding participants’ phenotypes were extracted from medical records and entered into a specific database.

TCD velocities were obtained as part of the standard care procedure. TCD examinations were performed and analyzed by an individual expert (C.M.S.). The STOP study protocol (4) has been used since 2007, with pulse TCD and a 2 MHz probe for a full Doppler test (model EME TC 2000, Nicolet; Madison, WI, USA).

Following standard care procedure, MRA was recommended to children with inadequate TCD, children with basilar arterial velocity above 130 cm/s, and children with anterior cerebral arterial (ACA) velocity above 170 cm/s.

Overt ischemic stroke, which was defined as a neurological deficit lasting more than 24 hours, was diagnosed by a hematologist who was in charge of follow-up study, and the diagnosis was done on the basis of available clinical and imaging results. Intracranial hemorrhage was not considered in the category of overt stroke. TIA was defined by the display of neurological signs following vascular disruption that resolve within 24 hours (2). Abnormal MRA was defined as stenosis or apparent occlusion of any vessel or arterial tortuosity, or Moyamoya disease (30). Cerebrovascular disease (CVD) was defined in the present study by the occurrence of at least one of the following clinical events: overt ischemic stroke; abnormal TCD as originally defined by STOP investigators (the highest time-averaged mean blood-flow velocity [TAMMX] \geq 200 cm/s in middle cerebral artery [MCA] and internal carotid artery [ICA]) (4); two consecutive TCD exams revealing the TAMMX equal or above 170 cm/s in the anterior cerebral arteries (31); abnormal MRA; and history of TIA. Because some subjects had experienced multiple cerebrovascular events, the first experience was used for dating the occurrence of the event. For subjects who had multiple TCD exams, the last exam was considered for the definition and dating. For children undergoing chronic transfusion therapy, treatment with hydroxyurea, or bone marrow transplantation, results from the last TCD exam before the initiation of therapy were considered.

White blood cell (WBC) count was determined using electronic cell counter (T-890, COULTER; Hialeah). Percentage of HbF was quantified by radial immunodiffusion (HbF Quiplate; Helena Laboratories; Beaumont). Arithmetic mean of WBC count and HbF concentration was calculated for children after they crossed the age of two years and a steady state value was obtained from these calculations. Values obtained from tests performed after blood transfusion (up to 90 days) and during significant clinical illness (serious infection, acute splenic sequestration, aplastic crisis), were disregarded. For children undergoing chronic transfusion therapy, treatment with hydroxyurea, or bone marrow transplantation, steady state values were determined from the mean of values registered before the initiation of therapy.

Statistical Analysis

Continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation and nominal variables as percentages. The Kolmogorov-Smirnov goodness-fit test was used to evaluate the normal distribution of continuous variables. For continuous variables that were normally distributed, the unpaired t-test was used to compare different groups. The nonparametric Mann–Whitney U test was used for continuous variables that were not normally distributed. Two outcomes were studied in the present report: 1) Overt ischemic stroke; and 2) CVD. Except in the overall analyses or when considering sickle cell genotypes, S β^0 -thal and S β^+ -thal type I children were not included in the statistical analysis of outcomes because they have less probability to have a stroke event (2) or CVD (see Results). Univariate associations between outcomes and covariates (genetic risk factors) were evaluated using two-tailed chi-square or Fisher's exact test. Statistically significant values were set at $p \leq 0.05$. Cumulative incidences of overt stroke or CVD were estimated by using Kaplan–Meier method [function (1-Survival)] and the log rank test was used to compare different subgroups. Birth date determined entry into the study program. Beginning of chronic transfusion therapy, hydroxyurea treatment, bone marrow transplantation, death by causes unrelated to outcomes, and last clinical visit (last TCD or MRA test for CDV) without events until July 2013 (end of study) were reasons for censored observations. Cox's regression was used to determine the independent effect of each genetic risk factor. The initial multivariate model included all covariates potentially associated with outcomes. The covariates were removed from the model, one by one through stepwise analysis and the final model included only those covariates that were statistically significant at $p < 0.10$. Statistical analyses were performed with SPSS 17.0 software (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA).

Results

Characteristics of subjects

Out of 411 children enrolled in this study, 386 (93.9%) had HbSS genotype, 23 (5.6%) had S β^0 -thal and two (0.5%) had S β^+ -thal type I genotype. Children had a

mean age of 9.56 ± 2.95 years (range 4.5–14.5 years), and 208 (50.6%) of them were male. Clinical, hematological, and genetic characteristics of the participants are shown in Table 1. No children with $S\beta^0$ -thal/ $S\beta^+$ -thal had overt stroke or CVD. Frequency of CVD was significantly lower in children with $S\beta^0$ -thal/ $S\beta^+$ -thal (0/20) than in SS children (61/348; $p = 0.05$). Age and steady state WBC count were significantly lower for $S\beta^0$ -thal/ $S\beta^+$ -thal group in comparison to the SS group ($p = 0.05$ and 0.04 , respectively). No other difference was found between SS and $S\beta^0$ -thal/ $S\beta^+$ -thal groups (Table 1). Mean follow-up was 7.67 ± 2.95 years (range 2.01–14.14 years), which correspond to 3,152 patient-years. The overall prevalence of overt stroke was 5.1% (95% CI 3.0%–7.2%) and the cumulative incidence of overt stroke by the age of 8.5 years was 6.6% (95% CI 3.9%–9.3%; Figure 1A). The overall prevalence of CVD was 16.6% (95% CI 13.0%–20.6%) and the cumulative incidence of CVD by the age of 11.5 years was 32.7% (95% CI 22.7%–42.7%; Figure 1B).

Table 1. Clinical, hematological and genetic characteristics of children with sickle cell disease in Minas Gerais, Brazil

Variables	Genotype			P value	Odds Ratio	95% CI
	SS n=386	$S\beta^0$ - thal/ $S\beta^+$ - thal n=25	Total n=411			
<i>Gender</i>						
male	196 (50.8%)	12 (48%)	208 (50.6%)	0.78 ^a	1.11	0.49-2.51
female	190 (48.9%)	13 (52%)	203 (49.4%)			
Age (years)	9.63±2.99	8.52±2.03	9.56±2.95	0.05 ^b		
<i>Outcome</i>						
Overt stroke	21 (5.4%)	0 (0%)	21 (5.1%)	0.63 ^c	0.94	0.91-0.96
Cerebrovascular disease ^d	61/348 (17.5%)	0/20(0%)	61/368 (16.6%)	0.05 ^c	0.93	0.90-0.96
Overt stroke	19 (5.5%)	0 (0%)	19 (5.2%)			
High risk TCD	29 (8.3%)	0 (0%)	29 (7.9%)			
TAMMX >170 cm/s in ACA	2 (0.6%)	0 (0%)	2 (0.5%)			
Transient Ischemic Attack	7 (2%)	0 (0%)	7 (1.9%)			
Abnormal MRA	4 (1.1%)	0 (0%)	4 (1.1%)			
<i>Hematologic variables</i>						
WBC ($10^9/L$; n=203)	16.13±3.36	13.86±3.1	16.03±3.37	0.048 ^e		
Hb F (%; n=194)	16.25±7.34	19.59±8.15	16.41±4.38	0.19 ^e		
<i>Genetic status</i>						
VCAM1 G1358C						
GG	333 (86.3%)	23 (92%)	356 (86.6%)	0.55 ^c	0.55	0.13-2.38
GC	53 (13.7%)	2 (8%)	55 (13.4%)			
CC	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)			
TNF- α G308A						
GG	283 (73.3%)	16 (64%)	299 (72.7%)	0.35 ^{c,f}	1.54	0.66-3.6

	GA	97 (25.1%)	9 (36%)	106 (25,8%)			
	AA	6 (1.6%)	0 (0%)	6 (1.5%)			
HBA deletion status							
	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	281 (72.8%)	18 (72%)	299 (72.7%)	1.00 ^{c,g}	1.04	0.42-2.56
	$\alpha\alpha/-\alpha^{3,7}$	98 (25.4%)	7 (28%)	105 (25.5%)			
	$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$	7 (1.8%)	0 (0%)	7 (1.7%)			

^a χ^2

^bMann-Whitney test

^cFisher's exact test

^d43 children did not have any of clinical neurologic events, but had no valid TCD or MRA data to be classified as having or not cerebrovascular disease

^eunpaired t-test

^fGG versus GA/AA

^g $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ vs $\alpha\alpha/-\alpha^{3,7}$ or $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$

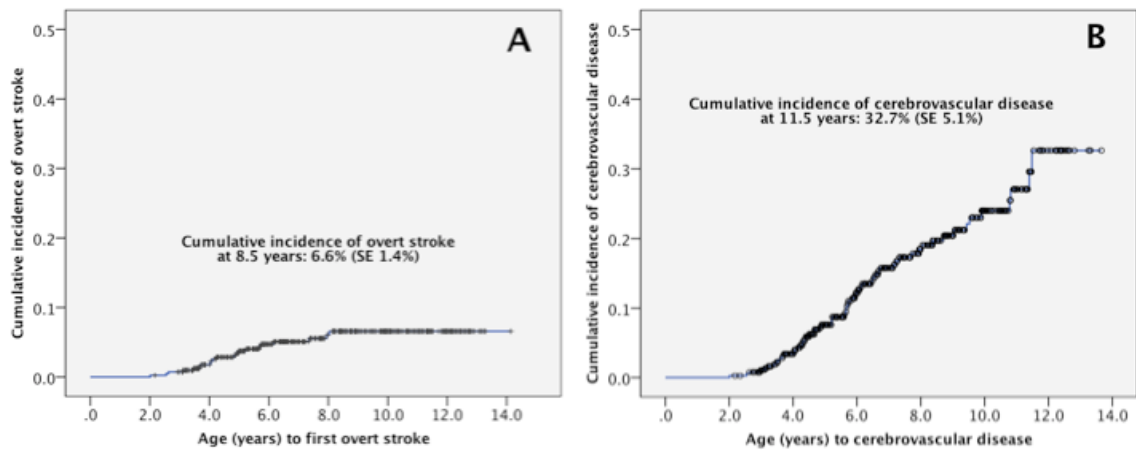


Figure 1. Cumulative incidence of cerebrovascular complications. **(A)** Cumulative incidence of overt stroke. **(B)** Cumulative incidence of cerebrovascular disease (overt stroke, transient ischemic attack, abnormal TCD, or abnormal cerebral angiography).

Function: $(1 - \text{survival})$, according to Kaplan-Meier method.

Genotyping results

Analysis of *HBA* deletions showed that 299 children (72.7%) were $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, 105 (25.5%) $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ and seven (1.7%) $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$. This means only $-\alpha^{3.7}$ deletion was detected. As far as TNF- α gene polymorphism (-308G>A) was concerned, 299 (72.7%) children had GG, 106 (25.8%) had GA, and six (1.5%) had AA genotypes. For VCAM1 gene polymorphism (c.1238G>C), 356 (86.6%) children had GG genotype and 55 (13.4%) had GC (Table 1).

Among children with $S\beta^0$ -thal ($n = 23$), 10 children (43.5%) had the nonsense codon 39 (C>T) mutation, nine had (39.1%) IVS-I-1 (G>A) mutation, three had (13%) IVS-II-1 (G>A) mutation, and one child had (4.4%) IVS-I-2 (T>C) mutation. One child with $S\beta^+$ -thal type I had the mutation IVS-1-110 (G>A) and the other one had the IVS-I-5 (G>A). Six (75%) children with S/HPFH genotype had the deletion type 2 and two (25%), had type 1.

Genetic risk factors for overt stroke in children with HbSS genotype

The prevalence of overt stroke was 3.9% (11/283) for children who had TNF- α GG genotype. It was 9.7% (10/103) for those with GA or AA genotypes. The cumulative incidence of overt stroke was significantly higher for children with TNF- α GA or AA genotypes compared to children with GG genotype ($p = 0.02$; Figure 2A). The prevalence of overt stroke was 7.1% (20/281) for children without *HBA* deletion ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). It was 1% (1/105) for those with one or two $-\alpha^{3.7}$ deletions. The cumulative incidence of overt stroke was significantly lower for children with *HBA* deletion compared to no deletions ($p = 0.02$; Figure 2B). The cumulative incidences of overt stroke for VCAM1 GG and GC genotype groups were not significantly different ($p = 0.49$). The final multivariate model for predicting risk of overt stroke incidence included TNF- α -308G>A polymorphism and *HBA* deletion status. The relative risk of overt stroke for children with $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ genotype was about 7 times higher (95% CI 0.97–53.9) than for those with $-\alpha^{3.7}$ deletions. It was 2.5 times higher for children with GA or AA than for those with GG at TNF- α -308G>A polymorphic site (95% CI 1.07–5.91; Table 2)

Table 2. Multivariate Cox's regression analyses to predict overt stroke in children with sickle cell anemia in Minas Gerais, Brazil

Variables	Relative Risk	95% Confidence Interval	P value
Model 1: All covariates			
VCAM1 G1358C genotype	1.67 ^a	0.56-4.96	0.35
TNF- α G308A genotype	2.52 ^b	1.07-5.93	0.03
HBA deletion status	7.47 ^c	1.0-55.86	0.05
Final model: Only covariates with P < 0.1			
TNF- α G308A genotype	2.5 ^b	1.07-5.91	0.03
HBA deletion status	7.23 ^c	0.97-53.95	0.05

^a GG to GC relative risk for overt stroke

^b GA or AA to GG relative risk for overt stroke

^c $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ to $\alpha\alpha/\alpha^{3.7}$ or $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ relative risk for overt stroke

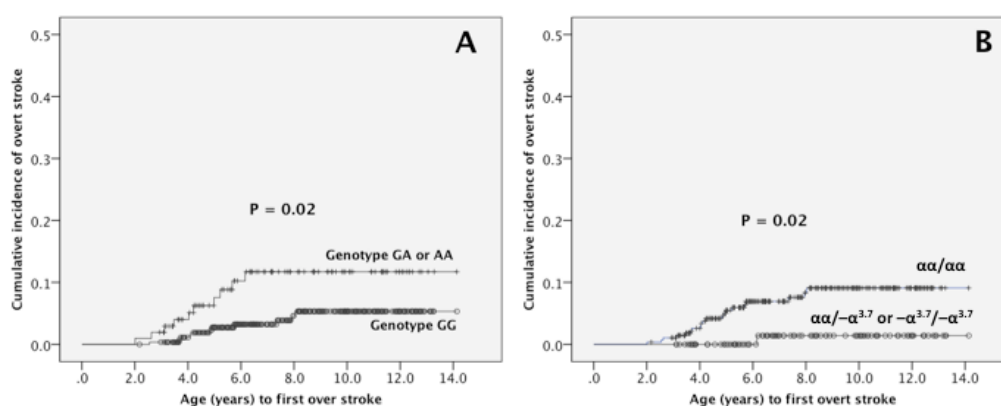


Figure 2. Cumulative incidence of cerebrovascular complications according to genotype. **(A)** Cumulative incidence of overt stroke in children with HbSS according to TNF- α G-308A genotype. The cumulative incidence for the GG group was 5.3% (*SE* 1.6%) while that for the GA or AA group was 11.7% (*SE* 3.5%; $p = 0.02$). **(B)** Cumulative incidence of overt stroke in children with HbSS according to alpha-thalassemia genotype. The cumulative incidence for the $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ group was 9.1% (*SE*

2%) while that for the $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ or $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ group was 1.4% (*SE* 1.4%; $p = 0.02$; only one $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ child had a stroke). Function: (1-survival), according to Kaplan–Meier method.

Genetic risk factors for CVD in children with HbSS genotype

The prevalence of CVD was 17.5% (45/257) for children who had TNF- α GG genotype. It was 17.6% (16/91) for those with GA or AA genotypes. Accordingly, the cumulative incidences of CVD were similar for both groups ($p = 0.7$). The prevalence of CVD for children with the VCAM1 GG genotype was 17.3% (52/301). It was 19.1% (9/47) for those with the GC genotype. Corresponding cumulative incidences of CVD were not significantly different ($p = 0.73$). The prevalence of CVD was 21.3% (54/253) for children without *HBA* deletion ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). It was 7.4% (7/95) for those with one or two $-\alpha^{3.7}$ deletions. The cumulative incidence of CVD was significantly lower for children with one or two *HBA* deletions ($p = 0.004$; Figure 3). The final multivariate model for predicting the risk of developing CVD included *HBA* deletion status only. The risk of developing CVD in children with one or two $-\alpha^{3.7}$ hybrid genes was 3 times lower than those with no *HBA* deletions (95% CI: 1.4–6.6) (Table 3).

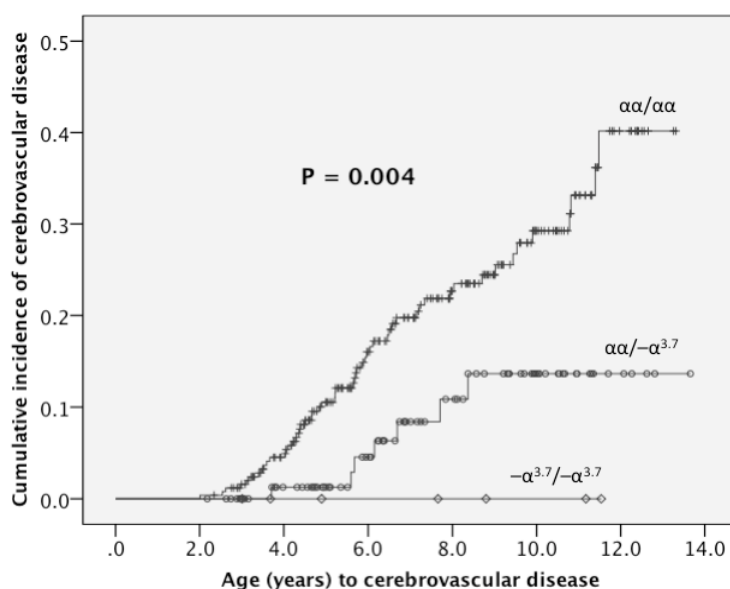


Figure 3. Cumulative incidence of cerebrovascular disease in children with HbSS according to alpha-thalassemia genotype. The cumulative incidence for the $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ group was 40.2% (*SE* 6.2%) and that for the $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ group was 13.7% (*SE* 5.0%); no child with the $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ genotype had cerebrovascular disease (linear trend $p = 0.004$). Function: (1-survival), according to Kaplan–Meier method.

Table 3. Multivariate Cox’s regression analyses to predict cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia in Minas Gerais, Brazil

Variables	Relative Risk	95% Confidence Interval	P value
Model 1: All covariates			
VCAM1 G1358C genotype	1.24 ^a	0.61-2.53	0.55
TNF- α G308A genotype	1.05 ^b	0.59-1.86	0.87
HBA deletion status	3.04 ^c	1.38-6.69	0.006
Final model: Only covariates with $P < 0.1$			
HBA deletion status	3.00 ^c	1.37-6.59	0.006

^a GG to GC relative risk for cerebrovascular disease

^b GA or AA to GG relative risk for cerebrovascular disease

^c $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ to $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$ or $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ relative risk for cerebrovascular disease

Discussion

We have studied the effect of genetic risk factors that have previously been associated with stroke in children with SCA. Our results suggested no association between VCAM1 c.1238G>C polymorphism and overt stroke or CVD. Previously published results suggested the association of minor allele C with lower risk of stroke (23). Nonsynonymous c.1238G>C SNP leads to a conservative amino acid change (Gly>Ala) at 413th position in the immunoglobulin domain 5 of VCAM1 molecule. This molecule has a large surface of interaction with the corresponding receptor, and thus, the weakly interacting methyl group added by substitution of glycine with alanine would not interfere with the proper function of the protein; therefore, the variant 413A may remain fully functional. Bioinformatic analyses using MutPred and PolyPhen2 algorithms also suggested that protein function would not be harmed, thereby providing support to our results (32, 33). Furthermore, the 413A VCAM-1 variant showed neither any potential difference in protein isoform levels nor any

impairment of in vitro cell-cell adhesion function (34). This is the second study to assess the effect of VCAM1 c.1238G>C polymorphism on the risk of stroke in children with SCA. Additional studies in different populations will be needed to confirm our findings.

The present study demonstrated that -308G>A polymorphism of the TNF- α gene was significantly associated with overt stroke, but not with CVD. Children with the allele A had 2.5-fold increased risk of getting overt stroke, thereby indicating a modest effect of this allele on susceptibility to overt stroke. Reports on TNF- α -308G>A polymorphism and the risk of stroke in SCA subjects have been controversial. Some results showed association of G allele with higher risk of stroke (14, 15), while other studies reported no such association (16, 35). Another study failed to find an association between TNF- α -308G>A polymorphism and MRA/MRI abnormalities in adults (36).

The present study is the first one to report an association between -308A allele and overt stroke. Subjects with sickle cell anemia have higher concentration of TNF- α than controls with HbAA (37, 38). The minor allele A has been associated with higher rate of transcription of TNF- α gene (39), and higher cytokine levels in Brazilian children with SCA (40). Based on current knowledge about pathophysiology of stroke in SCA (41), consequences secondary to high production of this pro-inflammatory cytokine such as stimulation of inflammation, activation of endothelial cells, activation of WBC (42), and induction of the coagulation cascade (43), would be consistent with an increased risk of stroke. TNF- α has been used to induce vaso-occlusion in sickle cell mice (44), adding further support to the biological plausibility of our findings. High levels of TNF- α have been associated with severe clinical manifestations in patients with SCA (38, 45, 46), and the allele A was associated with higher risk of acquiring acute splenic sequestration (40). Discrepancies in some previously published results may be due to differences in method design, outcome definition, and population variability. An intriguing observation derived from the present study was the lack of association between TNF- α -308G>A SNP and CDV. This implies that allele A would produce some phenotypic modification that increases the risk of stroke, the last stage of CVD, but not the risk of previous stages, such as TCD abnormalities. It is possible that allele A plays a role in the end-stage vasculopathy in these children but it is difficult to understand pathophysiologically the lack of association between the SNP and CVA. This lack of association may

indicate a true negative result and the association between TNF- α -308G>A polymorphism and overt stroke may be regarded more probably as a false positive result. Further studies are needed to understand the real influence of TNF- α -308G>A SNP on the risk of developing CVD.

As previously described by us and other researchers, *HBA* deletion was significantly associated with a decreased risk of overt stroke (2, 16, 18, 35, 47) and CVD (3, 17, 19, 20, 48). Children without *HBA* deletion had a 7-fold increased risk of overt stroke and a 3-fold increased risk of CVD. Absence of this association found in recently published studies probably occurs due to lack of power to detect a difference (22), or due to a selection bias (21). It is interesting to note that both cited reports showed a trend towards a protective association of *HBA* deletion on CVD prevalence. In our experience, high reticulocyte count was an independent risk factor for CVD in the multivariate analysis (49). Reduction of reticulocyte count caused by *HBA* deletion (20) may be crucial to protect children from overt stroke and CVD. Prioritization of children without *HBA* deletions for scheduling TCD tests can be a potential useful tool for designing clinical protocols.

Our results showed that S β^0 -thal/severe S β^+ -thal genotypes were significantly associated with a decreased risk of CDV. Although no child with those genotypes had an overt stroke, the prevalence difference in SS children was not statistically significant probably because the number of S β^0 -thal/S β^+ -thal cases and overt stroke events were both too small. A number of studies related to stroke risk factors have grouped together subjects with SS and S β^0 -thal genotypes (3, 17, 21, 50). Although similar in other clinical aspects (51), the risk of stroke and CVD may be actually different as suggested by the present study and by other investigators (2). As mentioned before for *HBA* deletion status, sickle cell genotype is a potential marker to prioritize children for TCD and imaging exams, but prospective studies are needed to support TCD protocol recommendations based on genotypes.

One limitation of the present study was the use of medical files as the source of retrospective data, even though these records were generated for clinical follow-up and not for research. Although the final sample for this study (n = 411) represents 89.2% of the corresponding total population followed up at Belo Horizonte Blood Center (n = 472), 38 children could not be reached during the study period and may represent milder forms of sickle cell disease. Similarly, 43 children with no TCD or MRA testing may also represent milder form of the disease. So the actual prevalence

of CVD might have been overestimated in the present study and may have incorporated biasness in evaluating the genetic risk factors associated with CVD and stroke.

Conclusions

In summary, this cohort study was the first to contradict previously reported association between VCAM1 c.1238G>C polymorphism and stroke in children with SCA. Furthermore, an association between TNF- α -308A allele and overt stroke, but not CVD, has been found. Also, our results have confirmed the protective role of *HBA* deletion status against stroke and cerebrovascular disease. Our findings suggest that children with S β^0 -thal/severe/S β^+ -thal genotype have less risk of developing cerebrovascular disease than children with SS genotype. Because CVD is associated with significant morbidity in children with sickle cell disease, and since TCD screening has some recognized limitations in assigning risk for CVD, additional prospective studies are needed to refine CVD risk stratification in children with sickle cell disease.

Acknowledgments

The authors acknowledge all subjects and parents for their cooperation in the study. The authors also thank the financial support of HEMOMINAS, Newborn Screening Program (Nupad-UFGM), FAPEMIG, CNPq, and CAPES.

References

1. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2004 Oct 9-15;364(9442):1343-60. PubMed PMID: 15474138.
2. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moehr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood*. 1998 Jan 1;91(1):288-94. PubMed PMID: 9414296. Epub 1998/02/07. eng.
3. Bernaudin F, Verlhac S, Arnaud C, Kamdem A, Chevret S, Hau I, et al. Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. *Blood*. 2011 Jan 27;117(4):1130-40; quiz 436. PubMed PMID: 21068435. Epub 2010/11/12. eng.
4. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and

abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med.* 1998 Jul 2;339(1):5-11. PubMed PMID: 9647873. Epub 1998/07/02. eng.

5. Adams RJ, McKie VC, Carl EM, Nichols FT, Perry R, Brock K, et al. Long-term stroke risk in children with sickle cell disease screened with transcranial Doppler. *Ann Neurol.* 1997 Nov;42(5):699-704. PubMed PMID: 9392568. Epub 1997/12/10. eng.

6. Jordan LC, Casella JF, Debaun MR. Prospects for primary stroke prevention in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2012 Jan 9. PubMed PMID: 22224940. Epub 2012/01/10. Eng.

7. Adams RJ, Brambilla DJ, Granger S, Gallagher D, Vichinsky E, Abboud MR, et al. Stroke and conversion to high risk in children screened with transcranial Doppler ultrasound during the STOP study. *Blood.* 2004 May 15;103(10):3689-94. PubMed PMID: 14751925.

8. Brambilla DJ, Miller ST, Adams RJ. Intra-individual variation in blood flow velocities in cerebral arteries of children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer.* 2007 Sep;49(3):318-22. PubMed PMID: 17243135. Pubmed Central PMCID: 2867598. Epub 2007/01/24. eng.

9. Rees DC, Dick MC, Height SE, O'Driscoll S, Pohl KR, Goss DE, et al. A simple index using age, hemoglobin, and aspartate transaminase predicts increased intracerebral blood velocity as measured by transcranial Doppler scanning in children with sickle cell anemia. *Pediatrics.* 2008 Jun;121(6):e1628-32. PubMed PMID: 18490379. Epub 2008/05/21. eng.

10. Ali SB, Moosang M, King L, Knight-Madden J, Reid M. Stroke recurrence in children with sickle cell disease treated with hydroxyurea following first clinical stroke. *Am J Hematol.* 2011 Oct;86(10):846-50. PubMed PMID: 21898530. Epub 2011/09/08. eng.

11. Fullerton HJ, Adams RJ, Zhao S, Johnston SC. Declining stroke rates in Californian children with sickle cell disease. *Blood.* 2004 Jul 15;104(2):336-9. PubMed PMID: 15054044. Epub 2004/04/01. eng.

12. Eckrich MJ, Wang WC, Yang E, Arbogast PG, Morrow A, Dudley JA, et al. Adherence to transcranial Doppler screening guidelines among children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer.* 2013 Feb;60(2):270-4. PubMed PMID: 22744996.

13. Mena F. Stroke in sickle cell anemia patients: a need for multidisciplinary approaches. *Atherosclerosis.* 2013 Aug;229(2):496-503. PubMed PMID: 23746538.

14. Hoppe C, Klitz W, D'Harlingue K, Cheng S, Grow M, Steiner L, et al. Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Stroke.* 2007 Aug;38(8):2241-6. PubMed PMID: 17600229. Epub 2007/06/30. eng.

15. Hoppe C, Klitz W, Cheng S, Apple R, Steiner L, Robles L, et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood.* 2004 Mar 15;103(6):2391-6. PubMed PMID: 14615367. Epub 2003/11/15. eng.

16. Flanagan JM, Frohlich DM, Howard TA, Schultz WH, Driscoll C, Nagasubramanian R, et al. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood.* 2011 Jun 16;117(24):6681-4. PubMed PMID: 21515823. Pubmed Central PMCID: 3123027. Epub 2011/04/26. eng.

17. Hsu LL, Miller ST, Wright E, Kutlar A, McKie V, Wang W, et al. Alpha Thalassemia is associated with decreased risk of abnormal transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell anemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003 Aug;25(8):622-8. PubMed PMID: 12902915. Epub 2003/08/07. eng.

18. Sebastiani P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT, Steinberg MH. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. *Nat Genet.* 2005 Apr;37(4):435-40. PubMed PMID: 15778708. Pubmed Central PMCID: 2896308. Epub 2005/03/22. eng.
19. Bernaudin F, Verlhac S, Chevret S, Torres M, Coic L, Arnaud C, et al. 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.* 2008 Nov 15;112(10):4314-7. PubMed PMID: 18772456. Epub 2008/09/06. eng.
20. Belisario AR, Rodrigues CV, Martins ML, Silva CM, Viana MB. Coinheritance of alpha-thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. *Hemoglobin.* 2010;34(6):516-29. PubMed PMID: 21077759. Epub 2010/11/17. eng.
21. Thangarajh M, Yang G, Fuchs D, Ponisio MR, McKinstry RC, Jaju A, et al. Magnetic resonance angiography-defined intracranial vasculopathy is associated with silent cerebral infarcts and glucose-6-phosphate dehydrogenase mutation in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2012 Nov;159(3):352-9. PubMed PMID: 22958163.
22. Filho IL, Leite AC, Moura PG, Ribeiro GS, Cavalcante AC, Azevedo FC, et al. Genetic polymorphisms and cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia from Rio de Janeiro, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2011 Jun;69(3):431-5. PubMed PMID: 21755116. Epub 2011/07/15. eng.
23. Taylor JGt, Tang DC, Savage SA, Leitman SF, Heller SI, Serjeant GR, et al. Variants in the VCAM1 gene and risk for symptomatic stroke in sickle cell disease. *Blood.* 2002 Dec 15;100(13):4303-9. PubMed PMID: 12393616. Epub 2002/10/24. eng.
24. Serjeant GR, Serjeant BE, Fraser RA, Hambleton IR, Higgs DR, Kulozik AE, et al. Hb S-beta-thalassemia: molecular, hematological and clinical comparisons. *Hemoglobin.* 2011;35(1):1-12. PubMed PMID: 21250876.
25. Belisario AR, Martins ML, Brito AM, Rodrigues CV, Silva CM, Viana MB. beta-globin gene cluster haplotypes in a cohort of 221 children with sickle cell anemia or Sbeta-thalassemia and their association with clinical and hematological features. *Acta Haematol.* 2010;124(3):162-70. PubMed PMID: 20938172. Epub 2010/10/13. eng.
26. Johnson VJ, Yucesoy B, Luster MI. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology. *Cytokine.* 2004 Sep 21;27(6):135-41. PubMed PMID: 15304242.
27. Ngo DA, Aygun B, Akinsheye I, Hankins JS, Bhan I, Luo HY, et al. Fetal haemoglobin levels and haematological characteristics of compound heterozygotes for haemoglobin S and deletional hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Br J Haematol.* 2011 Oct 24. PubMed PMID: 22017641. Epub 2011/10/25. Eng.
28. Craig JE, Barnetson RA, Prior J, Raven JL, Thein SL. Rapid detection of deletions causing delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. *Blood.* 1994 Mar 15;83(6):1673-82. PubMed PMID: 7510147.
29. Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood.* 2001 Jul 1;98(1):250-1. PubMed PMID: 11439976.

30. Steen RG, Emudianughe T, Hankins GM, Wynn LW, Wang WC, Xiong X, et al. Brain imaging findings in pediatric patients with sickle cell disease. *Radiology*. 2003 Jul;228(1):216-25. PubMed PMID: 12775848.
31. Kwiatkowski JL, Zimmerman R, Greenbaum B, Ohene-Frempong K. Stroke and elevated blood flow velocity in the anterior cerebral artery in sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004 May;26(5):323-6. PubMed PMID: 15111788. Epub 2004/04/28. eng.
32. Li B, Krishnan VG, Mort ME, Xin F, Kamati KK, Cooper DN, et al. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics*. 2009 Nov 1;25(21):2744-50. PubMed PMID: 19734154. Pubmed Central PMCID: 3140805.
33. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*. 2010 Apr;7(4):248-9. PubMed PMID: 20354512. Pubmed Central PMCID: 2855889.
34. Schmitz B, Vischer P, Brand E, Schmidt-Petersen K, Korb-Pap A, Guske K, et al. Increased monocyte adhesion by endothelial expression of VCAM-1 missense variation in vitro. *Atherosclerosis*. 2013 Oct;230(2):185-90. PubMed PMID: 24075742.
35. Domingos IF, Falcao DA, Hatzlhofer BL, Cunha AF, Santos MN, Albuquerque DM, et al. Influence of the beta haplotype and alpha-thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. *Ann Hematol*. 2014 Feb 4. PubMed PMID: 24493127.
36. Vicari P, Silva GS, Nogutti MA, Neto FM, dos Santos NJ, Massaro AR, et al. Absence of association between TNF-alpha polymorphism and cerebral large-vessel abnormalities in adults with sickle cell anemia. *Acta Haematol*. 2011;125(3):141-4. PubMed PMID: 21160173. Epub 2010/12/17. eng.
37. Bowers AS, Reid HL, Greenidge A, Landis C, Reid M. Blood viscosity and the expression of inflammatory and adhesion markers in homozygous sickle cell disease subjects with chronic leg ulcers. *PloS one*. 2013;8(7):e68929. PubMed PMID: 23922670. Pubmed Central PMCID: 3724890.
38. Kuvibidila S, Gardner R, Ode D, Yu L, Lane G, Warriar RP. Tumor necrosis factor alpha in children with sickle cell disease in stable condition. *Journal of the National Medical Association*. 1997 Sep;89(9):609-15. PubMed PMID: 9302858. Pubmed Central PMCID: 2608260.
39. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Molecular immunology*. 1997 Apr;34(5):391-9. PubMed PMID: 9293772.
40. Cajado C, Cerqueira BA, Couto FD, Moura-Neto JP, Vilas-Boas W, Dorea MJ, et al. TNF-alpha and IL-8: serum levels and gene polymorphisms (-308G>A and -251A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. *Cytokine*. 2011 Nov;56(2):312-7. PubMed PMID: 21802960.
41. Connes P, Verlhac S, Bernaudin F. Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2013 May;161(4):484-98. PubMed PMID: 23496688.
42. Movat HZ. Tumor necrosis factor and interleukin-1: role in acute inflammation and microvascular injury. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1987 Dec;110(6):668-81. PubMed PMID: 3316455.

43. Bauer KA, ten Cate H, Barzegar S, Spriggs DR, Sherman ML, Rosenberg RD. Tumor necrosis factor infusions have a procoagulant effect on the hemostatic mechanism of humans. *Blood*. 1989 Jul;74(1):165-72. PubMed PMID: 2752108.
44. Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Mar 5;99(5):3047-51. PubMed PMID: 11880644. Pubmed Central PMCID: 122470.
45. Qari MH, Dier U, Mousa SA. Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2012 Mar-Apr;18(2):195-200. PubMed PMID: 21949038.
46. Keikhaei B, Mohseni AR, Norouzirad R, Alinejadi M, Ghanbari S, Shiravi F, et al. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. *European cytokine network*. 2013 Mar;24(1):45-52. PubMed PMID: 23608554.
47. Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. *Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Blood*. 1995 Jul 15;86(2):776-83. PubMed PMID: 7606007. Epub 1995/07/15. eng.
48. Cox SE, Makani J, Soka D, L'Esperence V S, Kija E, Dominguez-Salas P, et al. Haptoglobin, alpha-thalassaemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase polymorphisms and risk of abnormal transcranial Doppler among patients with sickle cell anaemia in Tanzania. *Br J Haematol*. 2014 Feb 21. PubMed PMID: 24666344.
49. Silva CM, Giovani P, Viana MB. High reticulocyte count is an independent risk factor for cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Jan;56(1):116-21. PubMed PMID: 20949593. Epub 2010/10/16. eng.
50. Chang Milbauer L, Wei P, Enestein J, Jiang A, Hillery CA, Scott JP, et al. Genetic endothelial systems biology of sickle stroke risk. *Blood*. 2008 Apr 1;111(7):3872-9. PubMed PMID: 18156497. Pubmed Central PMCID: 2275038. Epub 2007/12/25. eng.
51. Serjeant GR, Sommereux AM, Stevenson M, Mason K, Serjeant BE. Comparison of sickle cell-beta0 thalassaemia with homozygous sickle cell disease. *Br J Haematol*. 1979 Jan;41(1):83-93. PubMed PMID: 420738.

8. Artigo 2 – Publicado no volume 126 do periódico *Blood* (DOI 10.1182/blood-2015-05-645176)

To the Editor:

Association between *ENPPI* K173Q and stroke in a newborn cohort of 395 Brazilian children with sickle cell anemia

Running Title: *ENPPI* K173Q mutation and stroke

Belisário, André Rolim^{1,2*}; Sales, Rahyssa Rodrigues^{2,3}; Toledo, Nayara Evelin³; Velloso-Rodrigues, Cibele⁴; Silva, Célia Maria³; and Viana, Marcos Borato²

¹ Centro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais, Fundação Hemominas, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil; ² Faculdade de Medicina/NUPAD, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; ³ Serviço de Pesquisa, Fundação Hemominas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; ⁴ Departamento Básico – Área de Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil

***Correspondence to:** André Rolim Belisário, Biological Tissue Center, Hemominas Foundation; Rua das Goiabeiras, 779, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil; Zip Code 33400-000. Phone: +55 (31) 3268.0548. Fax: 55 (31) 3248.9579. E-mail: andrebelisario@yahoo.com.br

Transcranial Doppler (TCD) screening and intensification therapy may reduce the risk of stroke from 11% to 1.9% in children with sickle cell anemia (SCA).¹ However, the relatively low specificity of TCD screening in identifying individuals at risk of stroke² highlights the need for prognostic tools with enhanced accuracy to enable the identification of individuals at the highest risk. Recently, Flanagan et al³ reported the association of *GOLGB1* Y1212C (rs3732410), and *ENPPI* K173Q (rs1044498) mutations with a decreased risk of stroke, whereas *PONI* Q192R (rs662) with an increased risk. Thus, the present study was undertaken to evaluate the influence of these mutations on the risk of developing overt ischemic stroke (hereafter referred to as “stroke”) in a newborn cohort from Minas Gerais, Brazil.

The study included 395 HbSS-genotyped children aged 6–16 years and who were followed-up at the Hemominas Foundation from birth until 12/31/2014. Stroke was defined as an acute neurological deficit lasting >24 h. Diagnosis was confirmed in all children by imaging assessments. Our study also analyzed high risk TCD as a second outcome, and this was defined as a time-averaged mean of the maximum velocity (TAMMX) ≥ 200 cm/s in the internal carotid or middle cerebral artery. Children who had suffered stroke as well as those for whom TCD screening was inadequate were excluded from the second analysis. Polymorphisms were detected by PCR/RFLP and confirmed by DNA sequencing in at least 5% of random samples.

Of the 395 children, 23 (5.8%) had stroke. The frequency of stroke was null (0/83) for children who harbored the *ENPPI* KK genotype, 6.8% (7/103) for those with QQ

genotype, and 7.7% (16/209) for children with KQ genotype, ($P=0.037$). The cumulative probability of stroke was significantly ($P=0.015$) higher for children with the QQ genotype than for those with the KK genotype (Fig. 1A). Similar results were obtained comparing QQ/KQ genotypes as one group with the KK group (Fig. 1B). Of the 333 children with valid TCD, 34 (10.2%) had high risk readings. The frequency of high risk TCD was 5.2% (4/77) for KK genotype, 11.2% (19/169) for KQ genotype, and 12.6% (11/87) for QQ genotype. The cumulative probability of high risk TCD was higher for children with the QQ genotype than for those with the KK genotype, but not significantly ($P=0.09$). The TAMMX of children with the QQ genotype was significantly higher than of those with the KK genotype ($P=0.018$). No association between *GOLGB1* Y1212C or *PONI* Q192R and stroke or stroke risk was detected (data not shown).

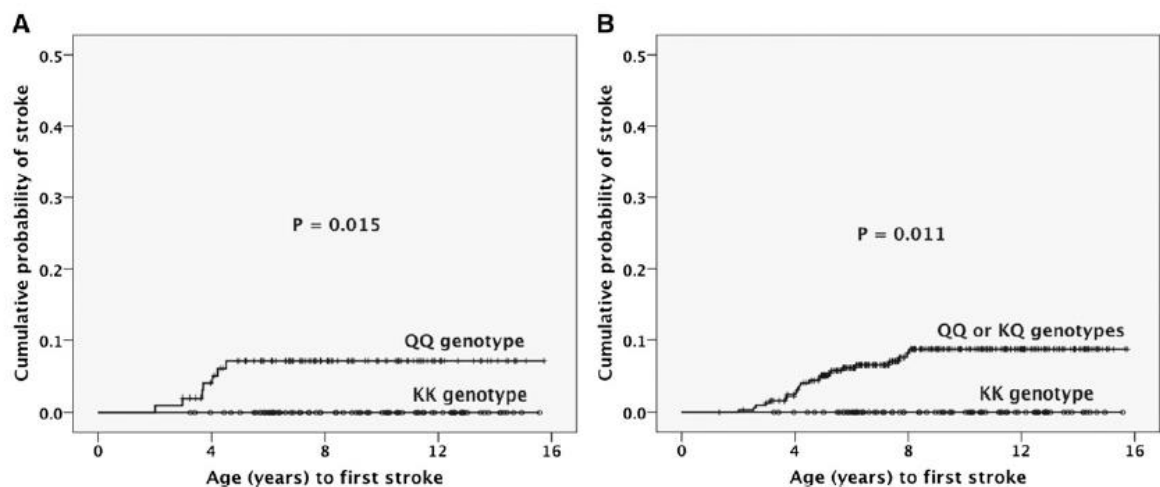


Figure 1. Cumulative probability of stroke according to *ENPP1* K173Q genotype. (A) The cumulative probability for the KK genotype group was 0% while that for the QQ group was 7.1% (SE 2.6%; $P = 0.015$). (B) The cumulative probability for the KK genotype group was 0% while that for the QQ or KQ group was 8.7% (SE 1.8%; $P = 0.011$). Function: (1-survival), according to Kaplan-Meier method.

In contrast with the results of Flanagan et al³ for whom *ENPP1* Q173 was associated with a decreased risk of stroke, our findings showed instead that *ENPP1* K173 was the "protective" variant. Our data further showed that only children with the KK genotype are "protected", suggesting the dominance of the Q allele. The K173Q variant (frequently reported as K121Q because of an incorrect assignment at the start codon in early studies on *ENPP1*) is located in the second somatomedin-B-like domain – a non-catalytic ectodomain of *ENPP1* that mediates protein homodimerization. The Q173 variant has been associated with insulin resistance⁴, which is a condition that predisposes to cardiovascular events⁵ and type-2 diabetes.⁶ In addition, an analysis showed that the Q173 variant was significantly associated with increased blood pressure⁷, which is a known independent risk factor for the development of stroke in individuals with SCA⁸. Furthermore, the Q173 variant has been significantly associated with a reduced nitric oxide (NO) synthase activity in human endothelial cells.⁷ NO lower bioavailability may be

considered a possible pathogenic mechanism by which the *ENPP1* K173Q modulates the risk of stroke in children with SCA. Evidence supporting this hypothesis includes that KK children had a significantly lower hemolytic rate, as measured by lower reticulocyte count and higher total hemoglobin concentration (data not shown), than QQ children. This would lead to reduced destruction rate of L-arginine, the substrate for NO production, as well as reduced scavenging of NO by free hemoglobin.

In this study, we did not detect any protective association between the *GOLGB1* Y1212C mutation and the risk of stroke, as proposed by Flanagan et al.³ In this respect, although it is considered that a cohort-designed study may be more reliable than other types of study for detecting genuine associations, it is possible that we failed to notice the modest effect exerted by *GOLGB1* Y1212C on the risk of stroke.

Consistent with the data of other investigators,⁹ our study found no association between the *PONI* Q192R mutation and stroke. Analyses using the PROVEAN¹⁰ and SIFT¹¹ algorithms suggest that there would be no impairment of protein function, which supports our results. Furthermore, in a meta-analysis study, *PONI* Q192R was found to have no effect on the risk of ischemic stroke in six populations of individuals without SCA.¹²

In conclusion, using longitudinal analysis, we have shown that the homozygous Q genotype of the *ENPP1* K173Q polymorphism in children with SCA was associated with an increased risk of stroke and, possibly, with the development of high risk TCD readings.

Acknowledgments

The authors acknowledge all subjects and parents for their cooperation in the study. The study protocol was approved by the Institutional Review Board and written informed consent and assent was obtained, when appropriate. The authors also thank the financial support of HEMOMINAS, Newborn Screening Program (Nupad-UFMG), FAPEMIG (PPM-00266-13), CNPq (304530/2011-5), and CAPES.

Contribution

A.R.B. designed the study, performed genotyping tests, collected data, analyzed the data and wrote the manuscript. R.S.R and N.E.T. performed genotyping tests and commented on the manuscript. C.V.R. performed bioinformatic analysis and commented on the manuscript. C.M.S. performed TCD measurements, collected data, and commented on the manuscript. M.B.V. designed the study, analyzed the data and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure

The authors declare no competing financial interests.

References

1. Bernaudin F, Verlhac S, Arnaud C, et al. Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. *Blood*. 2011;117(4):1130-1140; quiz 1436.

2. Adams RJ, McKie VC, Carl EM, et al. Long-term stroke risk in children with sickle cell disease screened with transcranial Doppler. *Ann Neurol*. 1997;42(5):699-704.
3. Flanagan JM, Sheehan V, Linder H, et al. Genetic mapping and exome sequencing identify 2 mutations associated with stroke protection in pediatric patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2013;121(16):3237-3245.
4. Goldfine ID, Maddux BA, Youngren JF, et al. The role of membrane glycoprotein plasma cell antigen 1/ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 in the pathogenesis of insulin resistance and related abnormalities. *Endocr Rev*. 2008;29(1):62-75.
5. Bacci S, Rizza S, Prudente S, et al. The ENPP1 Q121 variant predicts major cardiovascular events in high-risk individuals: evidence for interaction with obesity in diabetic patients. *Diabetes*. 2011;60(3):1000-1007.
6. McAteer JB, Prudente S, Bacci S, et al. The ENPP1 K121Q polymorphism is associated with type 2 diabetes in European populations: evidence from an updated meta-analysis in 42,042 subjects. *Diabetes*. 2008;57(4):1125-1130.
7. Bacci S, Di Paola R, Menzaghi C, et al. ENPP1 Q121 variant, increased pulse pressure and reduced insulin signaling, and nitric oxide synthase activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(10):1678-1683.
8. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood*. 1998;91(1):288-294.
9. Hoppe C, Klitz W, Cheng S, et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood*. 2004;103(6):2391-2396.
10. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One*. 2012;7(10):e46688.
11. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-1081.
12. Wang X, Cheng S, Brophy VH, et al. A meta-analysis of candidate gene polymorphisms and ischemic stroke in 6 study populations: association of lymphotoxin-alpha in nonhypertensive patients. *Stroke*. 2009;40(3):683-695.

9. Artigo 3

Reticulocyte count is the most important predictor of clinical ischemic stroke and high risk transcranial Doppler in a newborn cohort of 395 children with sickle cell anemia

Belisário, André Rolim ^{a,b*}; Sales, Rahyssa Rodrigues ^c; Toledo, Nayara Evelin ^c; Muniz, Maristela Braga de Sousa Rodrigues ^b; Velloso-Rodrigues, Cibele ^d; Silva, Célia Maria ^c; and Viana, Marcos Borato ^b

^aCentro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais, Fundação Hemominas, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil

^bFaculdade de Medicina/NUPAD, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

^cServiço de Pesquisa, Fundação Hemominas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

^dDepartamento Básico – Área de Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil

***Correspondence to:** André Rolim Belisário, Centro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais, Fundação Hemominas; Rua das Goiabeiras, 779, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil; Zip Code 33400-000. Phone: +55 (31) 3268.0548. Fax: 55 (31) 3248.9579. E-mail: andrebelisario@yahoo.com.br

Abstract

Stroke is a severe clinical manifestation of sickle cell anemia (SCA). Despite the prognostic relevance of transcranial Doppler (TCD), more accurate tools to assess stroke risk in children with SCA are required. Here, we describe the effect of clinical, laboratory, and molecular features on the risk of stroke and high-risk TCD in children from the newborn cohort of Minas Gerais, Brazil. Outcomes studied were clinical ischemic stroke and high-risk TCD. Clinical and hematological data were retrieved from children's records. Genetic markers, which were known for their association with stroke risk, were genotyped by polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism and sequencing. The cumulative incidence of clinical ischemic stroke by the age of 8 years was 7.4% and that of high-risk TCD by the age of 11.5 years was 14.2%. The final multivariate model for stroke risk included high white blood cell count and reticulocyte count, acute chest syndrome rate, and the single nucleotide polymorphisms (SNPs) *TEK* rs489347 and *TNF- α* rs1800629. The model for high-risk TCD included high reticulocyte count and the SNPs *TEK* rs489347 and *TGFBR3* rs284875. Children with risk factors should be considered for the intensive risk monitoring and for intervention therapy.

Introduction

Sickle cell anemia (SCA) is a monogenic disorder caused by a homozygous mutation in the β -globin gene, resulting in severe hemolytic anemia and vaso-occlusion [1]. Children with SCA are at high risk of neurological complications. Stroke is among the most serious complications in cases wherein early intervention is not provided, affecting 11% of individuals aged under 20 years [2]. Transcranial Doppler (TCD) screening and prophylactic blood transfusion program may reduce the risk of stroke occurrence by 92% [3]. However, TCD screening has limitations, and prophylactic blood transfusion program has several risks and disadvantages. Some children with high-risk TCD may not have a stroke, whereas children with normal TCD may have stroke [4]. Recently, in a single-center study conducted in Nigeria, none of the 17 children, who either had a high-risk TCD or whose parents or guardians refused prophylactic blood transfusion program, developed a stroke after a mean follow-up of 27.3 ± 11.1 months [5]. The optimal duration of prophylactic blood transfusions to prevent stroke occurrence and recurrence is unknown [6,7]. The long-term risks of transfusions include transmission of infectious diseases [8], alloimmunization [9], and iron overload. A study conducted at a comprehensive sickle cell center in the Children's Hospital of Philadelphia showed that 57.7% of the individuals with SCA undergoing prophylactic blood transfusions were alloimmunized despite transfusion from Rh-matched donors [9]. Although iron overload is manageable, the very high cost of chelation [10] and long-term risk of end-organ damage [11] may impede prophylactic blood transfusion programs. Other significant problems related to prophylactic blood transfusion programs are their high cost [12,13]; unavailability of blood, mainly in the developing countries [14]; and parents' refusal to accept the program [5]. No method exists to predict which children with high-risk TCD will not have a stroke, and so children may not benefit from prophylactic blood transfusions. Therefore, additional prognostic tools to properly identify the children at highest risk are required.

Several genetic polymorphisms have been suggested to modulate the stroke risk in children with SCA [15-17]. However, the strength of the association between these genetic polymorphisms and stroke risk is variable and controversial. Therefore, these associations should be validated in independent cohorts before using them as markers for stroke

prediction. Some laboratory features are well established as risk factors for stroke development, such as lower hemoglobin level [18], leukocytosis [19], and increased hemolysis as measured by lactate dehydrogenase [13], aspartate aminotransferase [20] levels, as well as reticulocyte count. Remarkably, reticulocyte count was the only significant risk factor in multivariate models in the newborn cohort of the Cooperative Study of Sickle Cell Disease (CSSCD) [21] and in a Brazilian newborn cohort [22]. Clinical features associated with acute hypoxemia seem to influence stroke development in SCA individuals, including the occurrence of acute chest syndrome [2], nocturnal [23] and diurnal hypoxemia [24,25], and aplastic crises secondary to erythrovirus B19 infection [26]. Other reports have identified further clinical risk factors for stroke, such as increased systolic blood pressure (SBP) [27,28] and a history of bacterial meningitis [29,20]. Stroke is a complex multifactorial and polygenic disorder that is influenced by many characteristics, each with only modest effects. The analysis of the combined effect of several characteristics may provide a more accurate prognostic model to predict stroke development in children with SCA. Here, we examine the effect of clinical, laboratory, and molecular features on the risk of stroke development and high-risk TCD in children from the newborn cohort of Minas Gerais, Brazil.

Methods

Study design and patients

The study protocol was approved by institutional review boards (Hemominas Foundation reference number 295 and Federal University of Minas Gerais reference number 154/11). Informed written consents were obtained from participants' parents or guardians and the children's assent was obtained, when appropriate. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki guidelines.

Minas Gerais is a Brazilian state located in the southeastern region of the country. It is the fourth state with the largest land area (586,522 km²) and the second most populated state (about 21 million inhabitants). The newborn screening program for sickle cell disease (SCD) was implemented in March 1998, and the overall incidence of SCD (SS, SC, S β -

thalassemia, and SD genotypes) was one in every 1,400 newborns [30]. Newborns screened for SCD were referred for clinical follow-up at the outpatient clinics of “Fundação Hemominas” (public blood bank). Currently, approximately 6,000 patients with SCD are followed up in 11 outpatient clinics across the state. For this study, 472 newborns with FS hemoglobin (Hb) profile, born between 01/1999 and 12/2008, and followed up at Belo Horizonte (state capital) outpatient clinic, were eligible for participation. Of these 472 children, six children did not receive consent from their parents for participation in this study, four children were transferred to other outpatient care units, one child was followed up by a private pediatrician, four children died, and 16 children could not be reached for blood collection during the study accrual. Thirteen children with a double heterozygous mutation for Hb S and a hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) deletion and 32 children who were proven to be S β -thalassemia genotype were excluded from this study. Additionally, one child who had hemorrhagic stroke was also excluded because the etiology of the event was unclear. Therefore, the study population comprised 395 Hb SS-genotyped children.

Clinical and hematological data

This study reports the outcome of children followed up regularly from birth to 06/2015. Patients were systematically assessed using the same treatment protocol that follows the current SCD management guidelines. TCD was introduced in 2007, and the Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia (STOP) study protocol [31] was used to screening children, with pulse TCD and a 2 MHz probe for a full Doppler test (model EME TC 2000, Nicolet, Madison, Wis., USA). All TCD examinations were conducted and analyzed by a single expert (C.M.S.).

Two outcomes were analyzed: clinical ischemic stroke and high-risk TCD. Clinical ischemic stroke was defined as a neurological deficit lasting over 24 h and/or a history of transient ischemic attack (TIA). TIA was defined as neurologic signs with vascular distribution that resolve within 24 h [2]. The diagnosis in all cases was confirmed by imaging assessments. High-risk TCD was defined as a time-averaged mean of the maximum velocity (TAMMX) ≥ 200 cm/s in the internal carotid or middle cerebral artery as

originally defined by STOP investigators [3]. For subjects that underwent multiple TCD examinations, the last examination was used for the definition and dating. For children that underwent prophylactic blood transfusion program, hydroxyurea therapy, or bone marrow transplantation, the last TCD examination before these procedures was used.

Acute chest syndrome (ACS) was defined as a new pulmonary radiological infiltrate of at least one complete lung segment, accompanied by fever and a combination of respiratory symptoms [32]. ACS rate was defined as the absolute number of episodes divided by the follow-up length of each child. The definition of systolic and diastolic blood pressures (SBP and DBP, respectively) was as provided elsewhere [28].

Total Hb, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), white blood cell (WBC) count, and platelet count were determined using electronic cell counter (Coulter T890, Coulter, Hialeah, FL, EUA or CELL-DYN Ruby, Abbott Laboratories, Santa Clara, CA, USA). Fetal hemoglobin (Hb F) percentage was quantified by radial immunodiffusion (HbF Quiplate, Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA). Reticulocyte count was determined by staining the blood smears with brilliant cresyl blue. The arithmetic mean of Hb, MCV, MCH, WBC, platelet, and reticulocyte counts were calculated for children above two years of age, and a steady-state value was obtained. The last examination of each child was considered as the Hb F steady-state value. Values obtained from tests performed after blood transfusion (up to 90 days) and during serious clinical illness (pain crises, serious infection, acute splenic sequestration, and aplastic crisis) were disregarded. For children who underwent prophylactic blood transfusion program, hydroxyurea therapy, or bone marrow transplantation, steady state values were determined from the data registered before initiating these treatment modalities.

Molecular Analysis

Genomic DNA extraction from blood samples was performed using a commercial kit (QIAamp, DNA Blood Mini Kit; Qiagen, Hilden, Germany). Ten possible genetic biomarkers, which were known for their association with stroke risk, were genotyped by PCR/RFLP (Table 1). The primers sequences, PCR protocols, and RFLP conditions are available upon request. At least 5% of samples were randomly selected for DNA

sequencing to confirm the genotype indicated by PCR/RFLP. No mistyping was observed. Sequence data were generated using ABI 3130xl capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the standard protocols. The detection of more frequent deletions ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--^{SEA}$, $--^{FIL}$, $--^{MED}$, $-(\alpha)^{20.5}$, and $--^{THAI}$) in *HBA* was conducted by multiplex

Gene	Marker	SNP	Minor allele ¹	Effect on stroke	References
Alpha globin	α -thalassemia	Not applicable	$-\alpha^{3.7}$	Protection	[34]
<i>ADCY9</i>	G/A	rs2238432	Allele A	Protection	[17,35]
<i>ANXA2</i>	C/T	rs11853426	Allele T	Susceptibility	[17,35]
<i>ENPP1</i>	K173Q	rs1044498	Allele C (Q173)	Protection	[16]
<i>GOLGB1</i>	Y1212C	rs3732410	Allele G (C1212)	Protection	[16]
<i>IL-4R</i>	S503P	rs1805015	Allele C (P503)	Susceptibility	[15]
<i>PON1</i>	Q192R	rs662	Allele A (Q192)	Protection	[16]
<i>TEK</i>	G/C	rs489347	Allele C	Susceptibility	[17,35]
<i>TGFBR3</i>	C/T	rs284875	Allele T	Susceptibility	[17,35]
<i>TNF-α</i>	-308G>A	rs1800629	Allele A	Controversial	[36,15,34]
<i>VCAM-1</i>	G413A	rs3783613	Allele C (A413)	Protection	[37,34]

gap-PCR as described previously [33]; the primer annealing temperature was increased to 62°C. For further validation of the results, 20% of samples were retested for *HBA* deletions.

Table 1. Previously published genetic markers reported to be risk factors for stroke in children with sickle cell anemia

¹According to data retrieved from dbSNP (NCBI)

Statistical Analysis

Continuous variables were expressed as mean and standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM), and nominal variables were expressed as percentages. The univariate analysis of continuous variables was performed using the unpaired t-test, except for those variables with gross deviation from normal distribution, in which case Mann–Whitney U test was used. The univariate analysis of nominal variables was performed using the cumulative incidence of competing events and Gray test. Prophylactic blood transfusion program, hydroxyurea therapy, and death were considered competitive events in outcome analysis. As described elsewhere [35], we tested dominant (AA vs Aa or aa) and recessive (AA or Aa vs aa) associations in the phenotype vs genotype analysis. Statistically

significant values in univariate analysis were set at $p \leq 0.05$. Multivariate analyses were performed using Fine and Gray proportional hazard regression competing events method. The initial multivariate model included all covariates with $p \leq 0.30$ in the univariate analysis. Subsequently, less significant covariate (higher p value) was removed from the model (backward selection), and the final model included only those covariates that were statistically significant at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed with the SPSS 17.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA) and Easy R softwares [38]. The Cox and Snell R^2 formula was used to estimate the predictive power of the final models.

Results

Patients and outcome rates

The mean follow-up period for the 395 Hb SS children was 9.04 years (SEM 0.17; range 1.32–15.74), providing 3,572 patient-years; 200 (50.6%) of them were male. Twenty-six (6.6%; 95% CI, 4.14–9.03%) of the 395 children had suffered from clinical ischemic stroke; 19 (4.8%) had stroke, 3 (0.7%) had TIA, and 4 (1%) had both. High-risk TCD was present in 29 (8.6%; 95% CI, 5.59–11.57%) out of 338 children; 26 (6.6%) children who had clinical ischemic stroke and 31 (7.8%) children who had inadequate TCD readings were excluded from the analysis for high-risk TCD (57/395; 14.4%). The cumulative incidence of clinical ischemic stroke by 8.0 years of age was 7.4% (95% CI, 4.66–10.14%) and that of high-risk TCD by 11.5 years of age was 14.2% (95% CI, 8.91–19.49%).

Out of 395 Hb SS children, 344 (87.1%) had at least one valid TCD test, 264 (76.7%) had low-risk, 35 (10.2%) low conditional, 14 (4.1%) high conditional, and 31 (9.0%) high-risk TCD (two children had high-risk TCD after TIA). The overall mean of TAMMX was 145.8 (SD 34.7 cm/s; range 87–269 cm/s). The mean TAMMX was 130.2 (SD 18.7 cm/s; range 87–166 cm/s), 176.9 (SD 4.5 cm/s; range 170–183 cm/s), 188.3 (SD 3.7 cm/s; range 185–199 cm/s), and 223.0 (SD 17.1 cm/s; range 201–269 cm/s) for children with low-risk, low conditional, high conditional, and high-risk TCD, respectively.

Analysis of risk factors for clinical ischemic stroke

Univariate analysis identified nine factors that significantly associated with clinical ischemic stroke (Supplemental Table 1). Lower age and total Hb, higher ACS rate, and higher SBP, MCV, WBC, and reticulocyte counts were the risk factors for clinical ischemic stroke, whereas *HBA* deletion status and *ENPPI* K173 variant (rs1044498) were protective factors. The final multivariate model for clinical ischemic stroke risk included WBC and reticulocyte counts, ACS rate, and the SNPs *TEK* rs489347 and *TNF- α* rs1800629 (Table 2). The Cox and Snell R^2 was 0.126.

Supplemental Table 1. Clinical, hematological, and genetic characteristics associated with clinical ischemic stroke in 395 children with sickle cell anemia

Variables	Clinical ischemic stroke			P value
	Yes n=26	No n=369	Total n=395	
<i>Gender</i>				
male	15 (7.5%)	185 (92.5%)	200 (100%)	0.510
female	11 (5.6%)	184 (94.4%)	195 (100%)	
<i>Age at stroke or end of follow-up (years)</i>	4.67 (0.31)	9.35 (0.17)	9.04 (0.17)	<0.001
<i>Clinical variables</i>				
Systolic blood pressure (n=320)	106.21 (1.88)	100.98 (0.41)	101.32 (0.41)	0.001
Diastolic blood pressures (n=320)	59.68 (1.62)	57.41 (0.42)	57.56 (0.40)	0.165
Acute chest syndrome rate	0.53 (0.09)	0.28 (0.02)	0.30 (0.02)	0.018
<i>Hematologic variables</i>				
Total hemoglobin (g/dL)	7.53 (0.12)	7.89 (0.05)	7.87 (0.46)	0.048
Mean corpuscular volume (fL)	95.49 (1.03)	92.08 (0.43)	92.30 (0.41)	0.040
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	30.25 (0.43)	29.48 (0.14)	29.53 (0.13)	0.152
White blood cell count ($10^9/L$)	18.81 (0.74)	15.22 (0.18)	15.47 (0.18)	<0.001
Platelet ($10^9/L$)	419.01 (27.62)	414.34 (5.68)	414.65 (5.60)	0.835
Reticulocyte (%)	18.42 (0.50)	14.64 (0.21)	14.89 (0.21)	<0.001
Hemoglobin F (%)	13.80 (1.37)	14.49 (0.39)	14.45 (0.38)	0.681
<i>Genetic factors</i>				
<i>HBA</i> deletion status				
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	24 (8.3%)	266 (91.7%)	290 (100%)	0.075 ^a
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	2 (2%)	96 (98%)	98 (100%)	0.023^b
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	0 (0%)	7 (100%)	7 (100%)	
<i>ADCY9</i>*				
GG	22 (8.0%)	254 (92.0%)	276 (100%)	0.230 ^a
Ga	4 (3.7%)	105 (96.3%)	109 (100%)	0.098 ^b
aa	0 (0%)	10 (100%)	10 (100%)	0.392 ^c
<i>ANXA2</i>*				
CC	6 (4.7%)	121 (95.3%)	127 (100%)	0.163 ^a
Ct	11 (5.9%)	177 (94.1%)	188 (100%)	0.300 ^b

tt	9 (11.3%)	71 (88.8%)	80 (100%)	0.063 ^c
<i>ENPPI*</i>				
AA (protein KK)	1 (1.2%)	82 (98.8%)	83 (100%)	0.072 ^a
Ac (protein KQ)	18 (8.6%)	191 (91.4%)	209 (100%)	0.026^b
cc (protein QQ)	7 (6.8%)	96 (93.2%)	103 (100%)	0.902 ^c
<i>GOLGB1*</i>				
AA (protein YY)	18 (6.2%)	273 (93.8%)	291 (100%)	0.476 ^a
Ag (protein YC)	8 (8.6%)	85 (91.4%)	93 (100%)	0.592 ^b
gg (protein CC)	0 (0%)	11 (100%)	11 (100%)	0.369 ^c
<i>IL-4R*</i>				
TT (protein SS)	12 (5.6%)	202 (94.4%)	214 (100%)	0.235 ^a
Tc (protein SP)	10 (6.6%)	142 (93.4%)	152 (100%)	0.097 ^b
cc (protein PP)	4 (13.8%)	25 (86.2%)	29 (100%)	0.730 ^c
<i>PONI*</i>				
GG (protein RR)	7 (6.1%)	108 (93.9%)	115 (100%)	0.730 ^a
Ga (protein QR)	11 (6.0%)	173 (94.0%)	184 (100%)	0.811 ^b
aa (protein QQ)	8 (8.3%)	88 (91.7%)	96 (100%)	0.428 ^c
<i>TEK*</i>				
GG	10 (4.7%)	201 (95.3%)	211 (100%)	0.249 ^a
Gc	13 (8.5%)	140 (91.5%)	153 (100%)	0.099 ^b
cc	3 (9.7%)	28 (90.3%)	31 (100%)	0.457 ^c
<i>TGFR3*</i>				
CC	22 (6.3%)	330 (93.8%)	352 (100%)	0.685 ^a
Ct	4 (9.5%)	38 (90.5%)	42 (100%)	0.436 ^b
tt	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	0.788 ^c
<i>TNF-α*</i>				
GG	15 (5.2%)	275 (94.8%)	290 (100%)	0.088 ^a
Ga	11 (11.2%)	87 (88.8%)	98 (100%)	0.059 ^b
aa	0 (0%)	7 (100%)	7 (100%)	0.481 ^c
<i>VCAM-1*</i>				
GG (protein GG)	22 (6.5%)	319 (93.5%)	341 (100%)	0.781 ^d
Gc (protein GA)	4 (7.4%)	50 (92.6%)	54 (100%)	
cc (protein AA)	0 (0%)	0 (0%)	0 (100%)	

For continuous variables, values are expressed as mean (standard error of the mean); for nominal variables, values are expressed as prevalence and percentages. *P* values were those resulting from unpaired t-test (or Mann–Whitney U test) for continuous variables and cumulative incidence of competing events and Gray test for nominal variables.

*Minor alleles, as recorded by dbSNP, are represented by lower case letters

^a AA vs Aa vs aa

^b dominant association (AA vs Aa or aa)

^c recessive association (AA or Aa vs aa)

^d dominant association (AA vs Aa)

Table 2. Multivariable regression model to predict stroke among 395 children with sickle cell anemia

Covariate	Hazard ratio	95% CI		P value
		Lower	Upper	
White blood cell count	1.243	1.111	1.391	0.00014
Reticulocyte count	1.289	1.130	1.472	0.00016
Acute chest syndrome rate	2.464	1.046	5.803	0.039
<i>TEK</i> rs489347				
GG	Reference			
GC or CC	3.052	1.277	7.294	0.012
<i>TNF-α</i> rs1800629				
GG	Reference			
GA or AA	2.791	1.290	6.041	0.0092

Analysis of risk factors for high-risk TCD

Univariate analysis identified six factors that significantly associated with high-risk TCD (Supplemental Table 2). Lower age and total Hb, higher WBC and reticulocyte counts, and the SNPs *TEK* rs489347 and *TGFBR3* rs284875 were the risk factors for high-risk TCD. The final multivariate model for high-risk TCD included reticulocyte count and the SNPs *TEK* rs489347 and *TGFBR3* rs284875 (Table 3). The Cox and Snell R^2 was 0.127.

Supplemental Table 2. Clinical, hematological and genetic characteristics associated with high-risk transcranial Doppler in 338 children with sickle cell anemia

Variables	High-risk TCD			P value
	Yes n=29	No n=309	Total n=338†	
<i>Gender</i>				
male	11 (6.7%)	154 (93.3%)	165 (100%)	0.204
female	18 (10.4%)	155 (89.6%)	173 (100%)	
<i>Age at high risk TCD or end of follow-up (years)</i>	6.69 (0.44)	8.68 (0.18)	8.75 (0.18)	<0.001
<i>Clinical variables</i>				
Systolic blood pressure (n=298)	104.36 (1.88)	100.49 (0.42)	100.81 (0.42)	0.055
Diastolic blood pressure (n=298)	59.33 (1.41)	56.98 (0.45)	57.18 (0.43)	0.134
Acute chest syndrome rate	0.23 (0.04)	0.27 (0.02)	0.27 (0.02)	0.454
<i>Hematologic variables</i>				
Total hemoglobin (g/dL)	7.42 (0.13)	7.93 (0.05)	7.90 (0.05)	0.004
Mean corpuscular volume (fL)	91.62 (2.88)	92.17 (0.43)	92.20 (0.48)	0.740
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	29.71 (0.44)	29.51 (0.15)	29.56 (0.15)	0.702
White blood cell count ($10^9/L$)	16.60 (0.72)	14.99 (0.19)	15.10 (0.19)	0.017
Platelet ($10^9/L$)	432.06 (14.54)	413.29 (6.24)	415.09 (5.96)	0.369
Reticulocyte (%)	18.54 (0.49)	14.30 (0.23)	14.68 (0.23)	<0.001

Hemoglobin F (%)	14.10 (1.29)	14.44 (0.43)	14.42 (0.41)	0.818
<i>Genetic factors</i>				
HBA deletion status				
$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	25 (10.3%)	218 (89.7%)	243 (100%)	0.205 ^a
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	4 (4.5%)	84 (95.5%)	88 (100%)	0.083 ^b
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	0 (0%)	7 (100%)	7 (100%)	
ADCY9*				
GG	21 (9.2%)	208 (90.8%)	229 (100%)	0.341 ^a
Ga	6 (6.1%)	93 (93.9%)	99 (100%)	0.633 ^b
aa	2 (20%)	8 (80%)	10 (100%)	0.227 ^c
ANXA2*				
CC	7 (6.3%)	104 (93.7%)	111 (100%)	0.132 ^a
Ct	19 (11.7%)	144 (88.3%)	163 (100%)	0.235 ^b
tt	3 (4.7%)	61 (95.3%)	64 (100%)	0.259 ^c
ENPP1*				
AA (protein KK)	3 (3.9%)	73 (96.1%)	76 (100%)	0.164 ^a
Ac (protein KQ)	15 (8.8%)	156 (91.2%)	171 (100%)	0.090 ^b
cc (protein QQ)	11 (12.1%)	80 (87.9%)	91 (100%)	0.166 ^c
GOLGB1*				
AA (protein YY)	24 (9.5%)	229 (90.5%)	253 (100%)	0.524 ^a
Ag (protein YC)	4 (5.4%)	70 (94.6%)	74 (100%)	0.266 ^b
gg (protein CC)	1 (9.1%)	10 (90.9%)	11 (100%)	0.889 ^c
IL-4R*				
TT (protein SS)	17 (9.3%)	166 (90.7%)	183 (100%)	0.846 ^a
Tc (protein SP)	10 (7.6%)	121 (92.4%)	131 (100%)	0.574 ^b
cc (protein PP)	2 (8.3%)	22 (91.7%)	24 (100%)	0.966 ^c
PON1*				
GG (protein RR)	10 (9.5%)	95 (90.5%)	105 (100%)	0.807 ^a
Ga (protein QR)	14 (9.0%)	141 (91.0%)	155 (100%)	0.663 ^b
aa (protein QQ)	5 (6.4%)	73 (93.6%)	78 (100%)	0.411 ^c
TEK*				
GG	18 (9.6%)	169 (90.4%)	187 (100%)	0.028^a
Gc	6 (4.8%)	120 (95.2%)	126 (100%)	0.447 ^b
cc	5 (20.0%)	20 (80.0%)	25 (100%)	0.028^c
TGFFR3*				
CC	22 (7.4%)	277 (92.6%)	299 (100%)	0.078 ^a
Ct	7 (18.4%)	31 (81.6%)	38 (100%)	0.032^b
tt	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	0.728 ^c
TNF-α*				
GG	26 (10.2%)	228 (89.8%)	254 (100%)	0.158 ^a
Ga	3 (3.8%)	75 (96.2%)	78 (100%)	0.057 ^b
aa	0 (0%)	6 (100%)	6 (100%)	0.465 ^c
VCAM-1*				
GG (protein GG)	24 (8.2%)	269 (91.8%)	293 (100%)	0.394 ^d

Gc (protein GA)	5 (11.1%)	40 (88.9%)	45 (100%)
cc (protein AA)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

For continuous variables, values are expressed as mean (standard error of the mean); for nominal variables, values are expressed as prevalence and percentages. *P* values were those resulting from unpaired t-test (or Mann–Whitney U test) for continuous variables and cumulative incidence of competing events and Gray test for nominal variables.

†57 out of 395 children had overt ischemic stroke or inadequate TCD and were excluded from the analysis for high-risk TCD.

*Minor alleles, as recorded by dbSNP, are represented by lower case letters

^a AA vs Aa vs aa

^b dominant association (AA vs Aa or aa)

^c recessive association (AA or Aa vs aa)

^d dominant association (AA vs Aa)

Table 3. Multivariable regression model to predict high-risk transcranial Doppler among 338 children with sickle cell anemia

Covariate	Hazard ratio	95% CI		P value
		Lower	Upper	
Reticulocyte count	1.461	1.265	1.687	2.6 x 10 ⁻⁷
<i>TEK</i> rs489347				
GG or GC	Reference			
CC	3.296	1.240	8.757	0.017
<i>TGFBR3</i> rs284875				
GG	Reference			
GA or AA	3.365	1.591	7.116	0.0015

Discussion

Stroke has been recognized as a catastrophic clinical manifestation of SCA, and efforts have been made to identify and treat children at highest risk. TCD screening has modified the natural history of stroke in children with SCA [13,39-42]. However, no single clinical tool to identify children who will certainly have a stroke is available. Some children with abnormal TCD readings are really prone to stroke events, whereas others are not, and prophylactic blood transfusions are unnecessarily provided. Therefore, refined methods for the primary prevention of stroke in children with SCA are required [43]. To date, this is the largest study that evaluates the simultaneous influence of clinical, laboratory, and molecular characteristics on the risk of stroke development and high-risk TCD. The results of our study indicate that several factors contribute to the occurrence of clinical ischemic stroke and high-risk TCD in children with SCA.

Consistent with a previous report of the CSSCD [21,44], reticulocyte count was the most powerful predictor of clinical ischemic stroke and high-risk TCD in our final multivariate models. For each unit percentage increase in reticulocyte count, the mean risk of clinical ischemic stroke and high-risk TCD increased by approximately 1.3% (95% CI, 1.13–1.47%) and 1.5% (95% CI, 1.27–1.69%), respectively. These data confirm the crucial role of reticulocytes in the genesis and progression of cerebral vasculopathy in children with SCA. The propensity of reticulocytes to adhere to the vascular endothelium, resulting in endothelial damage, may be the first step of a series of pathophysiological events that culminate in vasculopathy involving large cerebral arteries in children with SCA [45]. The endothelial activation induced by reticulocytes adhesion leads to vasoconstriction and the overexpression of adhesion molecules [46]. Additionally, high reticulocyte count denotes high hemolytic rate and nitric oxide (NO) consumption. Consequently, vascular smooth muscle relaxation is decreased, transcription of cell adhesion molecules is activated, and platelet activation/aggregation is increased [47]. Furthermore, the reduction of NO bioavailability may increase inflammation in children with SCA and may cause additional damage to the endothelium [48]. The benefits of hydroxyurea therapy in reducing stroke risk [49,50] could be partly attributed to its effect of reducing reticulocyte adhesion to the endothelium [51].

Our study also showed a significant association between WBC count and clinical ischemic stroke risk. An increase of a thousand leukocytes per mm^3 represented an increase in clinical ischemic stroke risk by one third (95% CI, 1.11–1.39). The CSSCD reported an association between WBC count and stroke in the univariate analysis but not in the final multivariate model [21,2]. The same held true when the risk of high-risk TCD [52] or abnormal MRA [13] in the French newborn cohort was assessed by the multivariate model. To the best of our knowledge, this is the first study that reports WBC count as an independent risk factor for stroke in children with SCA. These findings are biologically plausible. Adherent leukocytes play a primary direct role in the pathogenesis of sickle cell vaso-occlusion in transgenic mice with SCA [53]. The ability of leukocytes to adhere to other blood cells and to the endothelium contributes to blood flow obstruction, leading to insufficient delivery of oxygen to the brain. The injury caused by recurrence of ischemia reperfusion has an important role in the pathophysiology of cerebrovascular vasculopathy

in children with SCA [48]. This pathological process may be more severe in children with higher baseline WBC count. In addition, abnormally elevated WBC count would result in an elevated systemic chronic inflammatory state [54], contributing to vascular damage with intimal hyperplasia and smooth muscle proliferation.

The high incidence of conditional or high-risk TCD [55] and stroke [56] in siblings suggests that genetic modifiers may modulate the occurrence of this severe complication, and efforts were made to identify the genetic basis of stroke in children with SCA. Our findings showed that the SNP *TEK* rs489347 was significantly associated with clinical ischemic stroke in both univariate and multivariate analysis. According to our data, children carrying at least one allele C (GC or CC genotypes) have a chance of clinical ischemic stroke that is 3 times higher compared with those having the GG genotype. This finding is consistent with a previous report that showed a lower frequency of GG genotype in individuals who had stroke than those without stroke [17]. *TEK* gene encodes a receptor that belongs to the protein tyrosine kinase TIE-2 family. Angiopoietins have been identified as the ligands of the receptor tyrosine kinase TIE-2. The angiopoietin–TIE-2 system cooperates with TNF- α to induce the expression of endothelial cell adhesion molecules [57]. Our data from a previous report [34] and from this study have showed that *TNF- α* -308 G>A SNP, linked to *TNF- α* gene overexpression, was significantly associated with clinical ischemic stroke. The elevation of *TNF- α* and tyrosine kinase TIE-2 expression could increase signal transduction in angiopoietin–TIE-2 system, leading to the overexpression of adhesion molecules on the cerebrovascular vasculature, contributing to the development of sickle cell vasculopathy [48]. Future studies are warranted to provide a better understanding about the relationship between angiopoietin–TIE-2 system and stroke in children with SCA.

The SNP *TGFBR3* rs284875 was associated with an increased risk of high-risk TCD. Children with least one allele A have a chance of clinical ischemic stroke that is 3.4 times higher compared with to those having the GG genotype. In our study, the SNP *TGFBR3* rs284875 was not associated with clinical ischemic stroke risk. So, the mechanism by which it confers a risk of high-risk TCD probably rests upon an early cerebral vasculopathy stage. However, the functional effect of this SNP is unknown, and it

could be in linkage disequilibrium with another SNP that functionally confers additional risk of high-risk TCD. Our finding agrees with previous data by which the SNP *TGFBR3* rs284875 was linked with stroke risk [17,35].

In this study, we were unable to replicate the previously reported associations between SNPs and stroke risk [35,16,17,15]. One possible reason for failure to replicate some SNPs results is that the underlying genetics of cerebral vasculopathy in children with SCA is based on multiple genes with minor effects. Alternatively, some of these SNPs may have an indirect effect on stroke risk, as previously proposed [17].

Our results confirmed a previous report [2] showing a harmful effect of ACS in stroke risk. ACS probably modulates the stroke risk through acute hypoxia stress secondary to pulmonary disease. Hypoxia activates hypoxia-inducible factors, increasing the expression of gene that is potentially involved in cerebral vasculopathy. Some strokes in children with SCA occur without previous vasculopathy [46], during acute clinical illness (e.g., ACS, aplastic anemia, bacterial meningitis). One possible lesson from these findings is that improvement in disease management, such as intensive management of ACS crises [58], may prevent stroke occurrence in children with SCA.

SBP and DBP were not included in multivariate models because of a large number of missing observations. Our univariate results were similar to that of other reports [28,2], showing that clinical ischemic stroke was associated with higher SBP but not with DBP. In the present study, higher SBP was marginally associated with high-risk TCD, indicating that SBP is also important in the pathophysiology of cerebrovascular vasculopathy in children with SCA.

The final multivariate models using several previously published clinical, laboratory, and molecular risk factors explain about 13% of the variance in both final regression models. This indicates that other unknown factors significantly contribute to stroke risk and high-risk TCD. The present model should be prospectively tested to monitor routine protocols for stroke risk in children with SCA, although it seems to be an expensive tool to consider in countries where even TCD-screening implementation is not feasible [25]. An additional challenge for the scientific community is to identify cost-effective tools to predict stroke in children with sickle cell disease worldwide.

One important limitation of this study refers to the definition of outcomes. The natural history of stroke has been partially interrupted by the implementation of TCD screening and intensification therapy, mainly in developed countries [13,39-42]. Thus, children who carry genetic modifiers that could increase the stroke risk were misclassified in non-stroke group, introducing bias in the data analysis. Furthermore, the relative low number of stroke cases increased the chances for both false positive and false negative results and led to the instability of the model to predict stroke. Thus, we decided to use a high-risk TCD definition as a surrogate marker for stroke. However, it is certain that not all children with high-risk TCD would develop stroke. For example, about 60% of untreated children at a high-risk of experiencing stroke, as indicated by high-risk TCD, did not experience any episode of stroke within three years [4]. Another important limitation was the use of medical records as retrospective data source. These records were generated primarily for clinical follow-up and not for research. Additionally, the absence of systematic MRI evaluation prevents taking into account silent infarcts in the data analysis, which is one important risk factor for stroke in children with SCA [59,20].

In summary, our study identified clinical, laboratory, and molecular risk factors for clinical ischemic stroke and high-risk TCD development in children accrued from a SCA newborn cohort in Brazil. Reticulocyte count was the most important predictor of both outcomes. Children with risk factors should be considered for intensive risk monitoring using TCD screening and/or magnetic resonance technologies and considered for intervention therapy. We hope that this study will contribute for a better understanding about the pathophysiology of cerebrovascular disease in children with SCA.

References

1. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT (2010) Sickle-cell disease. *Lancet* 376 (9757):2018-2031. doi:10.1016/S0140-6736(10)61029-X
2. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, Wethers DL, Pegelow CH, Gill FM (1998) Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* 91 (1):288-294
3. Adams RJ, McKie VC, Brambilla D, Carl E, Gallagher D, Nichols FT, Roach S, Abboud M, Berman B, Driscoll C, Files B, Hsu L, Hurler A, Miller S, Olivieri N, Pegelow C, Scher C, Vichinsky E, Wang W, Woods G, Kutlar A, Wright E, Hagner S, Tighe F, Waclawiw

- MA, et al. (1998) Stroke prevention trial in sickle cell anemia. *Control Clin Trials* 19 (1):110-129. doi:S0197245697000998 [pii]
4. Adams RJ, McKie VC, Carl EM, Nichols FT, Perry R, Brock K, McKie K, Figueroa R, Litaker M, Weiner S, Brambilla D (1997) Long-term stroke risk in children with sickle cell disease screened with transcranial Doppler. *Ann Neurol* 42 (5):699-704. doi:10.1002/ana.410420505
 5. Lagunju IA, Brown BJ, Sodeinde OO (2013) Chronic blood transfusion for primary and secondary stroke prevention in Nigerian children with sickle cell disease: a 5-year appraisal. *Pediatr Blood Cancer* 60 (12):1940-1945. doi:10.1002/pbc.24698
 6. Adams RJ, Brambilla D (2005) Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med* 353 (26):2769-2778. doi:353/26/2769 [pii] 10.1056/NEJMoa050460
 7. Bernaudin F, Verlhac S, Arnaud C, Kamdem A, Hau I, Leveille E, Vasile M, Kasbi F, Madhi F, Fourmaux C, Biscardi S, Gluckman E, Socie G, Dalle JH, Epaud R, Pondarre C (2016) Long term follow-up of children with sickle cell anemia treated for abnormal transcranial Doppler velocities. *Blood*. doi:10.1182/blood-2015-10-675231
 8. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ (1996) The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med* 334 (26):1685-1690. doi:10.1056/NEJM199606273342601
 9. Chou ST, Jackson T, Vege S, Smith-Whitley K, Friedman DF, Westhoff CM (2013) High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood* 122 (6):1062-1071. doi:10.1182/blood-2013-03-490623
 10. Payne KA, Desrosiers MP, Caro JJ, Baladi JF, Lordan N, Proskorovsky I, Ishak K, Rofail D (2007) Clinical and economic burden of infused iron chelation therapy in the United States. *Transfusion* 47 (10):1820-1829. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01398.x
 11. Vichinsky E, Butensky E, Fung E, Hudes M, Theil E, Ferrell L, Williams R, Louie L, Lee PD, Harmatz P (2005) Comparison of organ dysfunction in transfused patients with SCD or beta thalassemia. *Am J Hematol* 80 (1):70-74. doi:10.1002/ajh.20402
 12. Wayne AS, Schoenike SE, Pegelow CH (2000) Financial analysis of chronic transfusion for stroke prevention in sickle cell disease. *Blood* 96 (7):2369-2372
 13. Bernaudin F, Verlhac S, Arnaud C, Kamdem A, Chevret S, Hau I, Coic L, Leveille E, Lemarchand E, Lesprit E, Abadie I, Medejel N, Madhi F, Lemerle S, Biscardi S, Bardakdjian J, Galacteros F, Torres M, Kuentz M, Ferry C, Socie G, Reinert P, Delacourt C (2011) Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. *Blood* 117 (4):1130-1140; quiz 1436. doi:blood-2010-06-293514 [pii] 10.1182/blood-2010-06-293514
 14. Ali SB, Moosang M, King L, Knight-Madden J, Reid M (2011) Stroke recurrence in children with sickle cell disease treated with hydroxyurea following first clinical stroke. *Am J Hematol* 86 (10):846-850. doi:10.1002/ajh.22142
 15. Hoppe C, Klitz W, Cheng S, Apple R, Steiner L, Robles L, Girard T, Vichinsky E, Styles L (2004) Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood* 103 (6):2391-2396. doi:10.1182/blood-2003-09-3015 2003-09-3015 [pii]
 16. Flanagan JM, Sheehan V, Linder H, Howard TA, Wang YD, Hoppe CC, Aygun B, Adams RJ, Neale GA, Ware RE (2013) Genetic mapping and exome sequencing identify 2

- mutations associated with stroke protection in pediatric patients with sickle cell anemia. *Blood* 121 (16):3237-3245. doi:10.1182/blood-2012-10-464156
17. Sebastiani P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT, Steinberg MH (2005) Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. *Nat Genet* 37 (4):435-440. doi:ng1533 [pii]
10.1038/ng1533
18. Zimmerman SA, Ware RE (1998) Inherited DNA mutations contributing to thrombotic complications in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol* 59 (4):267-272. doi:10.1002/(SICI)1096-8652(199812)59:4<267::AID-AJH1>3.0.CO;2-W [pii]
19. Hyacinth HI, Gee BE, Adamkiewicz TV, Adams RJ, Kutlar A, Stiles JK, Hibbert JM (2012) Plasma BDNF and PDGF-AA levels are associated with high TCD velocity and stroke in children with sickle cell anemia. *Cytokine* 60 (1):302-308. doi:10.1016/j.cyto.2012.05.017
20. Miller ST, Macklin EA, Pegelow CH, Kinney TR, Sleeper LA, Bello JA, DeWitt LD, Gallagher DM, Guarini L, Moser FG, Ohene-Frempong K, Sanchez N, Vichinsky EP, Wang WC, Wethers DL, Younkin DP, Zimmerman RA, DeBaun MR (2001) Silent infarction as a risk factor for overt stroke in children with sickle cell anemia: a report from the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *J Pediatr* 139 (3):385-390. doi:S0022-3476(01)26647-5 [pii]
10.1067/mpd.2001.117580
21. Meier ER, Wright EC, Miller JL (2014) Reticulocytosis and anemia are associated with an increased risk of death and stroke in the newborn cohort of the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Am J Hematol* 89 (9):904-906. doi:10.1002/ajh.23777
22. Silva CM, Giovani P, Viana MB (2011) High reticulocyte count is an independent risk factor for cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer* 56 (1):116-121. doi:10.1002/pbc.22680
23. Kirkham FJ, Hewes DK, Prengler M, Wade A, Lane R, Evans JP (2001) Nocturnal hypoxaemia and central-nervous-system events in sickle-cell disease. *Lancet* 357 (9269):1656-1659. doi:S0140673600048212 [pii]
24. Quinn CT, Variste J, Dowling MM (2009) Haemoglobin oxygen saturation is a determinant of cerebral artery blood flow velocity in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 145 (4):500-505. doi:BJH7652 [pii]
10.1111/j.1365-2141.2009.07652.x
25. Lagunju I, Sodeinde O, Brown B, Akinbami F, Adedokun B (2014) Transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell anemia: Clinical and laboratory correlates for elevated blood flow velocities. *Journal of clinical ultrasound : JCU* 42 (2):89-95. doi:10.1002/jcu.22099
26. Wierenga KJ, Serjeant BE, Serjeant GR (2001) Cerebrovascular complications and parvovirus infection in homozygous sickle cell disease. *J Pediatr* 139 (3):438-442. doi:10.1067/mpd.2001.117070
27. Rodgers GP, Walker EC, Podgor MJ (1993) Is "relative" hypertension a risk factor for vaso-occlusive complications in sickle cell disease? *Am J Med Sci* 305 (3):150-156
28. Pegelow CH, Colangelo L, Steinberg M, Wright EC, Smith J, Phillips G, Vichinsky E (1997) Natural history of blood pressure in sickle cell disease: risks for stroke and death associated with relative hypertension in sickle cell anemia. *The American journal of medicine* 102 (2):171-177. doi:S000293439600407X [pii]

29. de Montalembert M, Beauvais P, Bachir D, Galacteros F, Girot R (1993) Cerebrovascular accidents in sickle cell disease. Risk factors and blood transfusion influence. French Study Group on Sickle Cell Disease. *European journal of pediatrics* 152 (3):201-204
30. Fernandes AP, Januario JN, Cangussu CB, Macedo DL, Viana MB (2010) Mortality of children with sickle cell disease: a population study. *Jornal de pediatria* 86 (4):279-284. doi:doi:10.2223/JPED.2005
31. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, Abboud M, Gallagher D, Kutlar A, Nichols FT, Bonds DR, Brambilla D (1998) 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 (1):5-11. doi:10.1056/NEJM199807023390102
32. Stuart MJ, Nagel RL (2004) Sickle-cell disease. *Lancet* 364 (9442):1343-1360. doi:10.1016/S0140-6736(04)17192-4
33. Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS (2001) A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood* 98 (1):250-251
34. Belisario AR, Nogueira FL, Rodrigues RS, Toledo NE, Cattabriga AL, Velloso-Rodrigues C, Duarte FO, Silva CM, Viana MB (2015) 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
35. Flanagan JM, Frohlich DM, Howard TA, Schultz WH, Driscoll C, Nagasubramanian R, Mortier NA, Kimble AC, Aygun B, Adams RJ, Helms RW, Ware RE (2011) Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood* 117 (24):6681-6684. doi:blood-2011-01-332205 [pii] 10.1182/blood-2011-01-332205
36. Hoppe C, Klitz W, D'Harlingue K, Cheng S, Grow M, Steiner L, Noble J, Adams R, Styles L (2007) Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Stroke* 38 (8):2241-2246. doi:STROKEAHA.107.483115 [pii] 10.1161/STROKEAHA.107.483115
37. Taylor JGt, Tang DC, Savage SA, Leitman SF, Heller SI, Serjeant GR, Rodgers GP, Chanock SJ (2002) Variants in the VCAM1 gene and risk for symptomatic stroke in sickle cell disease. *Blood* 100 (13):4303-4309. doi:10.1182/blood-2001-12-0306 2001-12-0306 [pii]
38. Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone marrow transplantation* 48 (3):452-458. doi:10.1038/bmt.2012.244
39. McCarville MB, Goodin GS, Fortner G, Li CS, Smeltzer MP, Adams R, Wang W (2008) Evaluation of a comprehensive transcranial doppler screening program for children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer* 50 (4):818-821. doi:10.1002/pbc.21430
40. Fullerton HJ, Adams RJ, Zhao S, Johnston SC (2004) Declining stroke rates in Californian children with sickle cell disease. *Blood* 104 (2):336-339. doi:10.1182/blood-2004-02-0636 2004-02-0636 [pii]
41. Armstrong-Wells J, Grimes B, Sidney S, Kronish D, Shiboski SC, Adams RJ, Fullerton HJ (2009) Utilization of TCD screening for primary stroke prevention in children with sickle cell disease. *Neurology* 72 (15):1316-1321. doi:72/15/1316 [pii]

10.1212/WNL.0b013e3181a110da

42. Enniful-Eghan H, Moore RH, Ichord R, Smith-Whitley K, 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 (3):479-484. doi:S0022-3476(10)00239-8 [pii]

10.1016/j.jpeds.2010.03.007

43. Jordan LC, Casella JF, Debaun MR (2012) Prospects for primary stroke prevention in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 157 (1):14-25. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.09005.x

44. Meier ER, Fasano RM, Estrada M, He J, Luban NL, McCarter R (2015) Early Reticulocytosis and Anemia Are Associated with Abnormal and Conditional Transcranial Doppler Velocities in Children with Sickle Cell Anemia. *J Pediatr*. doi:10.1016/j.jpeds.2015.10.031

45. Platt OS (2005) Preventing stroke in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 353 (26):2743-2745. doi:353/26/2743 [pii]

10.1056/NEJMp058274

46. Switzer JA, Hess DC, Nichols FT, Adams RJ (2006) Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. *Lancet Neurol* 5 (6):501-512. doi:S1474-4422(06)70469-0 [pii]

10.1016/S1474-4422(06)70469-0

47. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH (2007) Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood reviews* 21 (1):37-47. doi:10.1016/j.blre.2006.07.001

48. Connes P, Verlhac S, Bernaudin F (2013) Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 161 (4):484-498. doi:10.1111/bjh.12300

49. Zimmerman SA, Schultz WH, Burgett S, Mortier NA, Ware RE (2007) Hydroxyurea therapy lowers transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anemia. *Blood* 110 (3):1043-1047. doi:10.1182/blood-2006-11-057893 [pii]

10.1182/blood-2006-11-057893

50. Ware RE, Davis BR, Schultz WH, Brown RC, Aygun B, Sarnaik S, Odame I, Fuh B, George A, Owen W, Luchtman-Jones L, Rogers ZR, Hilliard L, Gauger C, Piccone C, Lee MT, Kwiatkowski JL, Jackson S, Miller ST, Roberts C, Heeney MM, Kalfa TA, Nelson S, Imran H, Nottage K, Alvarez O, Rhodes M, Thompson AA, Rothman JA, Helton KJ, Roberts D, Coleman J, Bonner MJ, Kutlar A, Patel N, Wood J, Piller L, Wei P, Luden J, Mortier NA, Stuber SE, Luban NL, Cohen AR, Pressel S, Adams RJ (2015) Hydroxycarbamide versus chronic transfusion for maintenance of transcranial doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia-TCD With Transfusions Changing to Hydroxyurea (TWiTCH): a multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(15)01041-7

51. Chaar V, Laurance S, Lapoumeroulie C, Cochet S, De Grandis M, Colin Y, Elion J, Le Van Kim C, El Nemer W (2014) Hydroxycarbamide decreases sickle reticulocyte adhesion to resting endothelium by inhibiting endothelial lutheran/basal cell adhesion molecule (Lu/BCAM) through phosphodiesterase 4A activation. *The Journal of biological chemistry* 289 (16):11512-11521. doi:10.1074/jbc.M113.506121

52. Bernaudin F, Verlhac S, Chevret S, Torres M, Coic L, Arnaud C, Kamdem A, Hau I, Grazia Neonato M, Delacourt C (2008) G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia,

- and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. *Blood* 112 (10):4314-4317. doi:blood-2008-03-143891 [pii] 10.1182/blood-2008-03-143891
53. Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS (2002) Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (5):3047-3051. doi:10.1073/pnas.052522799
54. Nebor D, Bowers A, Hardy-Dessources MD, Knight-Madden J, Romana M, Reid H, Barthelemy JC, Cumming V, Hue O, Elion J, Reid M, Connes P, Group CS (2011) Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympatho-vagal balance, blood viscosity and inflammation. *Haematologica* 96 (11):1589-1594. doi:10.3324/haematol.2011.047365
55. Kwiatkowski JL, Hunter JV, Smith-Whitley K, Katz ML, Shults J, Ohene-Frempong K (2003) Transcranial Doppler ultrasonography in siblings with sickle cell disease. *Br J Haematol* 121 (6):932-937. doi:4276 [pii]
56. Driscoll MC, Hurllet A, Styles L, McKie V, Files B, Olivieri N, Pegelow C, Berman B, Drachtman R, Patel K, Brambilla D (2003) Stroke risk in siblings with sickle cell anemia. *Blood* 101 (6):2401-2404. doi:10.1182/blood.V101.6.2401.101/6/2401 [pii]
57. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, Gale NW, Witzenrath M, Rosseau S, Suttorp N, Sobke A, Herrmann M, Preissner KT, Vajkoczy P, Augustin HG (2006) Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nature medicine* 12 (2):235-239. doi:10.1038/nm1351
58. Miller ST (2011) How I treat acute chest syndrome in children with sickle cell disease. *Blood* 117 (20):5297-5305. doi:10.1182/blood-2010-11-261834
59. Thangarajh M, Yang G, Fuchs D, Ponisio MR, McKinstry RC, Jaju A, Noetzel MJ, Casella JF, Barron-Casella E, Hooper WC, Boulet SL, Bean CJ, Pyle ME, Payne AB, Driggers J, Trau HA, Vendt BA, Rodeghier M, DeBaun MR (2012) Magnetic resonance angiography-defined intracranial vasculopathy is associated with silent cerebral infarcts and glucose-6-phosphate dehydrogenase mutation in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 159 (3):352-359. doi:10.1111/bjh.12034

10. Artigo 4 – Publicado no periódico *Pediatric Blood & Cancer* (DOI: 10.1002/pbc)

Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brazilian children with sickle cell anemia is not associated with clinical ischemic stroke or high-risk transcranial Doppler

Short running title: G6PD deficiency and sickle cell anemia

Belisário, André Rolim ^{a,b*}, PhD; Sales, Rahyssa Rodrigues ^c, BS; Toledo, Nayara Evelin ^c, BS; Velloso-Rodrigues, Cibele ^d, PhD; Silva, Célia Maria ^c, MD, PhD; and Viana, Marcos Borato ^b, MD, PhD

^a Centro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais, Fundação Hemominas, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil

^b Faculdade de Medicina/NUPAD, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

^c Serviço de Pesquisa, Fundação Hemominas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

^d Departamento Básico – Área de Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil

***Correspondence to:** André Rolim Belisário, Centro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais, Fundação Hemominas; Rua das Goiabeiras, 779, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil; Zip Code 33400-000. Phone: +55 (31) 3268.0548. Fax: 55 (31) 3248.9579. E-mail: andrebelisario@yahoo.com.br

Abstract: 249 words

Main text: 1,867 words

Number of tables: 02

Number of Supplemental files: 01

Keywords: sickle cell anemia, cerebrovascular disease, stroke, glucose-6-phosphate dehydrogenase, transcranial Doppler ultrasound

Abstract

Background: Stroke is a severe complication of sickle cell anemia (SCA). The role of G6PD deficiency in the development of stroke in children with SCA is controversial.

Procedure: The aim of this study was to investigate the association of clinical ischemic stroke, high-risk transcranial Doppler (TCD), and hematological features with molecular variants usually linked to G6PD deficiency or with the biochemical activity of G6PD in a cohort of 395 Brazilian children with SCA. G6PD activity was quantitatively determined using an enzymatic-colorimetric assay. *G6PD* mutations were determined by PCR-RFLP and sequencing. Clinical and hematological data were retrieved from the children's records.

Results: The prevalence of molecularly-defined deficiency (hereafter, molecular deficiency) was 4.3% (95%CI: 2.3%–6.3%). The mean G6PD activity was 16.88 U/g Hb [standard error of the mean (SEM) 0.28] in the group without G6PD molecular deficiency and 8.43 (SEM 1.01) U/g Hb in the group with G6PD A⁻ molecular deficiency. G6PD molecular deficiency was not associated with any hematological features. No effects of G6PD molecular deficiency on clinical ischemic stroke or high-risk TCD were detected. The mean G6PD activity was similar in children who had clinical ischemic stroke and in those without stroke. Similar results were obtained in analyses comparing children who had high-risk TCD and those without high-risk TCD. **Conclusions:** Our study demonstrated

that G6PD molecular deficiency was not associated either with clinical ischemic stroke or high-risk TCD. Similarly, we found no associations between G6PD enzyme activity and stroke or high-risk TCD. Small sample size precludes definitive conclusions.

Introduction

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is the most common human enzymopathy and affects approximately 5% of individuals worldwide [1]. In red blood cells, the reaction catalyzed by G6PD is the only source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate to protect cells against oxidative injury and avoid premature lysis [2]. G6PD deficiency was postulated to modulate the severity of sickle cell anemia (SCA) [3]. However, contradictory results have been reported and the impact of G6PD deficiency on the phenotype of SCA is unknown [4-6], mainly its influence on cerebral vasculopathy [6-15].

We aimed to investigate the association of clinical ischemic stroke, high-risk transcranial Doppler (TCD), and hematological features with molecular variants usually linked to G6PD deficiency or with the biochemical activity of G6PD in a cohort of 395 Brazilian children with SCA.

Methods

This was a retrospective cohort study in children with SCA from Minas Gerais, Brazil. The study population consisted of 395 children with the Hb SS genotype, followed up from birth until June 2015 at “Fundação Hemominas”, Minas Gerais, Brazil. The study was approved by the institutional review boards (#295, and 154/11) and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki guidelines. Informed written consents were obtained from participants’ parents or guardians and the children’s assent was obtained, when appropriate.

Usual hematological data were determined using an electronic cell counter (Coulter T890, Coulter, Hialeah, FL, USA or CELL-DYN Ruby, Abbott Laboratories, Santa Clara, CA, USA). Percentage of fetal hemoglobin (Hb F) was quantified by radial immunodiffusion (HbF Quiplate, Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA). Reticulocyte count was determined using smears stained with brilliant cresyl blue. Arithmetic means of hemoglobin (Hb), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), white blood cells (WBC), platelets, and reticulocytes were calculated for children after they had reached the age of two years. A steady state value was obtained from these calculations. The last exam was considered to be the Hb F steady state value. Values obtained from tests performed after blood transfusions (up to 90 days) and during significant clinical illness were disregarded. For children undergoing prophylactic blood transfusion therapy (PBTT), treatment with hydroxyurea, or bone marrow transplantation, steady state values were determined from the mean of values registered before the initiation of these modalities of treatment.

The quantitative determination of G6PD activity on whole blood samples was performed using an enzymatic colorimetric assay (*NeoLISA*® G6PD, Interscientific Corporation, Hollywood, FL, USA). All tests were performed in duplicate. Samples for each child were collected once during steady-state clinical status (absence of blood transfusion up to 90 days or significant clinical illness for at least three months). There were 277/395 children (70%) who satisfied this condition.

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using a commercial kit (QIAamp, DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Six *G6PD* variants found in the Brazilian population [1] were determined by PCR-RFLP. The conditions for

reactions are given in Supplemental Table I. At least 5% of the samples were subjected to DNA sequencing to confirm PCR-RFLP results. Children had the G6PD isoform defined according to the A376G (rs1050829) polymorphism genotype: G6PD **B** indicates hemizyosity for the 376A allele in males and **BB** homozygosity in females; G6PD **A** indicates hemizyosity for the 376G allele in males, and **AA** homozygosity in females; and G6PD **BA** denotes heterozygosity for alleles 376A and 376G in females. For the purpose of this study, G6PD molecularly-defined deficiency (hereafter, molecular deficiency) was defined as hemizyosity for one of the tested alleles in males (A^- or B^-) and homozygosity in females (A^-A^- , B^-B^- , or A^-B^-).

Two outcomes were analyzed: clinical ischemic stroke or high-risk TCD. Clinical ischemic stroke was defined as a neurological deficit lasting more than 24 hours and/or a history of transient ischemic attack (TIA) [16]. The diagnosis was confirmed by imaging assessments in all cases. High-risk TCD was defined as the time averaged mean of the maximum velocity (TAMMX) ≥ 200 cm/s in the internal carotid or middle cerebral artery as originally defined by STOP investigators [17]. Children who had suffered clinical ischemic stroke as well as those for whom TCD screening was inadequate were excluded from the analysis for the second outcome. For subjects who had multiple TCD tests, the last one was considered for the analysis. For children undergoing PBTT, treatment with hydroxyurea, or bone marrow transplantation, the result from the last TCD exam before the initiation of therapy was considered.

Continuous variables were expressed as mean values with standard error of the mean (SEM), and nominal variables as numbers and percentages. Unpaired t-tests were used to compare different groups of continuous variables. Levene's test was used to assess

the equality of variances. One-way ANOVA with post-hoc analysis (Bonferroni) was used to compare means among three or more groups. Linear regression analysis was used in detecting correlations between G6PD enzyme activity and reticulocyte count or total Hb concentration. Univariate associations between outcomes (clinical ischemic stroke or high-risk TCD) and G6PD molecular deficiency were evaluated using a two-tailed Fisher's exact test. Statistically significant values were set at $P \leq 0.05$. Statistical analyses were performed with SPSS 17.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

The mean follow-up for the cohort was 9.04 years (SEM 0.17; range: 1.32–15.74), totaling 3,572 patient-years; 200 (50.6%) were male. Twenty-six (6.6%) children had suffered from clinical ischemic stroke; 19 (4.8%) had overt stroke, 3 (0.7%) had TIA, and 4 (1%) had both. High-risk TCD was present in 29/338 (8.6%) of the children. Children who had clinical ischemic stroke ($n=26$) and those with inadequate TCD ($n=31$) were excluded from the analysis for high-risk TCD (57/395; 14.4%).

The overall prevalence of G6PD molecular deficiency was 4.3% (95%CI: 2.3%–6.3%). There were 17 G6PD deficient A^- males (8.5%; 95%CI: 4.6%–12.4%). No female child was deficient, but 23 (11.8%) out of 195 were heterozygous for the A^- variant (either A^-A or A^-B). Only the 202A/376G molecular deficient variant was detected. The frequency of the allele G6PD A^- (202A/376G) was 0.085 in males and 0.058 in females ($P=0.23$). The prevalence of isoform A (376G with or without concomitant 202A) was 18.6% (95%CI: 15.5%–21.8%) and that of isoform B (A376) was 81.4% (95%CI: 78.2%–84.5%).

The mean G6PD activity (n=277) was 16.88 U/g Hb (SEM 0.28; range: 5.30–30.74) in the group without G6PD molecular deficiency and 8.43 U/g Hb (SEM 1.01; range: 2.19–13.94) in the group with G6PD A⁻ molecular deficiency ($P<0.001$).

In males, the mean G6PD activity was highest in children with the G6PD B isoform, intermediate in the group with G6PD A, and lowest in the group with G6PD A⁻ (Table I; $P<0.001$). In females, the mean G6PD activity was highest in the group with G6PD BB isoform and lowest in the group with G6PD AA⁻ isoform, but not significantly different (Table I; $P=0.068$). Children with the G6PD A isoform (hemizygoty or homozygoty; n=16) showed 85.2% of the enzymatic activity of G6PD when compared with those with the G6PD B isoform (hemizygoty or homozygoty; n = 208) (14.79 vs 17.36, respectively; $P=0.003$).

TABLE I. G6PD enzyme activity according to the isoform status in children with sickle cell anemia from the Minas Gerais state, Brazil

G6PD genotype	Gender	N (%)	G6PD U/g Hb (SEM)	<i>P</i> value
G6PD B	male (n=144)	116 (80.6)	17.99 (0.46)	< 0.001 ^a
G6PD A		14 (9.7)	14.73 (0.79)	<0.05 ^b
G6PD A ⁻		14 (9.7)	8.43 (1.01)	
G6PD BB	female (n=133)	92 (69.2)	16.56 (0.42)	0.068 ^a
G6PD BA		25 (18.8)	16.31 (0.77)	>0.05 ^c
G6PD AA		2 (1.5)	15.19 (1.59)	
G6PD BA ⁻		11 (8.3)	13.47 (1.51)	
G6PD AA ⁻		3 (2.3)	12.00 (1.84)	

^a One-way ANOVA; ^b Bonferroni post-hoc test; the difference between the means of the groups was always significant; ^c Bonferroni post-hoc test; comparisons of the means were always nonsignificant.

G6PD molecular deficiency was not associated with the means of total Hb, MCV, MCH, WBC, platelet, Hb F, or reticulocyte count, in males or females (Table II). G6PD activity showed a weak positive correlation with the reticulocyte count ($r=0.125$; $P=0.037$) and a weak negative correlation with the Hb concentration ($r=-0.156$; $P=0.009$). The same held true in the analyses restricted to males. As expected, the reticulocyte count had a strong negative correlation with the Hb concentration ($r=-0.65$; $P<0.001$).

TABLE II. Association of G6PD molecular deficiency with hematological features in children with sickle cell anemia from the Minas Gerais state, Brazil

	Males (n=200)			Females (n=195)		
	Normal (n=183) ^a	G6PD A ⁻ (n=17) ^a	<i>P</i> value ^b	Normal G6PD (BB, AA or BA; n=172) ^a	G6PD A ⁻ (heterozygosity BA ⁻ or AA ⁻ ; n=23) ^a	<i>P</i> value ^b
Hb (g/dL)	7.74 (0.06)	7.60 (0.23)	0.53	8.04 (0.07)	7.77 (0.20)	0.19
MCV (fL)	92.42 (0.53)	91.99 (1.47)	0.81	92.44 (0.71)	90.61 (1.76)	0.38
MCH (pg)	29.40 (0.19)	29.60 (0.51)	0.76	29.74 (0.21)	28.98 (0.60)	0.21
WBC (10 ⁹ /L)	15.72 (0.26)	15.53 (0.78)	0.82	15.22 (0.29)	15.07 (0.49)	0.85
Platelet (10 ⁹ /L)	415.95 (8.71)	437.05 (27.69)	0.48	414.26 (8.21)	390.80 (16.35)	0.31
Hb F (%)	13.86 (0.55)	13.66 (1.73)	0.91	15.33 (0.58)	12.91 (1.28)	0.15
Reticulocyte (%)	15.28 (0.27)	15.65 (0.99)	0.70	14.37 (0.34)	15.07 (0.75)	0.47

^a mean (standard error of the mean); ^b unpaired t-test.

The prevalence of clinical ischemic stroke was null (0/17) for children who had G6PD molecular deficiency. The prevalence was 6.9% (26/378; $P=0.62$) for those without molecular deficiency. The prevalence of high risk TCD was 14.3% (2/14) for children who had G6PD molecular deficiency, and 8.3% (27/324) for those without the molecular deficiency ($P=0.34$). Similar results were obtained in the analysis restricted to males

($P=0.62$ and 0.24 , respectively), and G6PD A⁻ heterozygosity females ($P=1.00$ and 0.68 , respectively).

Mean G6PD activity was 16.57 (2.32) U/g Hb in children who had clinical ischemic stroke ($n=4$; samples collected before PBTT) and 16.45 (0.30) U/g Hb ($n=273$) in children without the event ($P=0.96$). Similar results were obtained in the analysis restricted to males ($P=0.94$). The mean G6PD activity was 17.89 (2.14) U/g Hb in children who had high-risk TCD ($n=5$; samples collected before PBTT) and 16.51 (0.31) U/g Hb ($n=246$) in children without high-risk TCD ($P=0.56$). Similar results were obtained in the analysis restricted to males ($P=0.38$). All these analyses were repeated controlling for the reticulocyte count. G6PD activity was associated neither with clinical stroke nor with high-risk TCD.

Discussion

The prevalence of clinical ischemic stroke or high-risk TCD was not significantly different in the groups with and without G6PD molecular deficiency. This lack of association has been reported in almost all studies that used molecular analysis as the method for characterizing G6PD deficiency [5,10,12,13] and is biologically plausible because male A⁻ or female A⁻A⁻ genotypes (95% of 140 children investigated in these four studies) are known to lead to a mild or moderate reduction in G6PD activity, as demonstrated in our study. A single study reported that 376G or 202A alleles were independent risk factor for intracranial magnetic resonance angiography (MRA) arteriopathy in males with SCA [17].

Consistent with data from other reports that measured G6PD activity [5,8,9], we did not detect any difference in the mean G6PD activity in groups with and without clinical

ischemic stroke or high-risk TCD. Reports from Créteil (France) have demonstrated association between G6PD activity and high-risk TCD and/or vasculopathy on MRA [6,7]. It is difficult to explain these controversial results. Theoretically, the influence of G6PD on stroke risk appears improbable, because one of the most powerful predictors of stroke risk, increased reticulocyte count [18-20], also elevates G6PD activity, as demonstrated in our study. However, genetic background heterogeneity among populations and methodological issues may result in contradictory results.

The current analysis has several limitations. First, the lab kit used to measure G6PD enzyme activity is a screening test and, while quantitative, is not fully adequate for research purposes. In addition, G6PD activity values used for statistical analyses were derived from a single sample for each child. Due to intra-subject variability, this value does not necessarily represent the steady-stage G6PD activity for a particular child. Second, we used medical records as the source of retrospective data. These records were generated for clinical follow-up and not for research. Third, although molecular variants in our study represent more than 97% of the variants reported in Brazil [21], underestimation of the real prevalence of G6PD molecular deficiency may have occurred due to rare variants not detected. Lastly, the number of cases with concomitant SCA and G6PD deficiency was too small, and our study might therefore have been underpowered to detect associations between G6PD molecular deficiency/G6PD activity and clinical ischemic stroke or high-risk TCD.

In conclusion, although underpowered, our results showed that G6PD molecular deficiency or G6PD activity were not associated with either clinical ischemic stroke or high-risk TCD in Brazilian children with SCA. Additionally, G6PD molecular deficiency

was not associated with hematological features of SCA. Further large-scale prospective longitudinal studies controlled for ancestry are warranted to elucidate the relationship of G6PD deficiency with stroke susceptibility in children with SCA.

Acknowledgments

The authors acknowledge all subjects and parents for their cooperation in the study. The authors also thank the financial support of Fundação Hemominas, Newborn Screening Program (Nupad-UFMG), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG; grant # PPM-00266-13), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant # 304530/2011-5), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, Hall SA, Beutler E. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cells Mol Dis* 2009;42:267-278.

2. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 2008;371:64-74.
3. Steinberg MH, West MS, Gallagher D, Mentzer W. Effects of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency upon sickle cell anemia. *Blood* 1988;71:748-752.
4. Nouraie M, Reading NS, Campbell A, Minniti CP, Rana SR, Luchtman-Jones L, Kato GJ, Gladwin MT, Castro OL, Prchal JT, Gordeuk VR. Association of G6PD with lower haemoglobin concentration but not increased haemolysis in patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2010;150:218-225.
5. Benkerrou M, Alberti C, Couque N, Haouari Z, Ba A, Missud F, Boizeau P, Holvoet L, Ithier G, Elion J, Baruchel A, Ducrocq R. Impact of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on sickle cell anaemia expression in infancy and early childhood: a prospective study. *Br J Haematol* 2013;163:646-654.
6. Bernaudin F, Verlhac S, Chevret S, Torres M, Coic L, Arnaud C, Kamdem A, Hau I, Grazia Neonato M, Delacourt C. 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* 2008;112:4314-4317.
7. Bernaudin F, Verlhac S, Arnaud C, Kamdem A, Chevret S, Hau I, Coic L, Leveille E, Lemarchand E, Lesprit E, Abadie I, Medejel N, Madhi F, Lemerle S, Biscardi S, Bardakdjian J, Galacteros F, Torres M, Kuentz M, Ferry C, Socie G, Reinert P, Delacourt C. Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. *Blood* 2011;117:1130-1140.

8. Rees DC, Lambert C, Cooper E, Bartram J, Goss D, Deane C, Thein SL. Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency is not associated with cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Blood* 2009;114:742-743.
9. Miller ST, Milton J, Steinberg MH. G6PD deficiency and stroke in the CSSCD. *Am J Hematol* 2011;86:331.
10. Flanagan JM, Frohlich DM, Howard TA, Schultz WH, Driscoll C, Nagasubramanian R, Mortier NA, Kimble AC, Aygun B, Adams RJ, Helms RW, Ware RE. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood* 2011;117:6681-6684.
11. Thangarajh M, Yang G, Fuchs D, Ponisio MR, McKinsty RC, Jaju A, Noetzel MJ, Casella JF, Barron-Casella E, Hooper WC, Boulet SL, Bean CJ, Pyle ME, Payne AB, Driggers J, Trau HA, Vendt BA, Rodeghier M, DeBaun MR. Magnetic resonance angiography-defined intracranial vasculopathy is associated with silent cerebral infarcts and glucose-6-phosphate dehydrogenase mutation in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2012;159:352-359.
12. Domingos IF, Falcao DA, Hatzlhofer BL, Cunha AF, Santos MN, Albuquerque DM, Fertrin KY, Costa FF, Azevedo RC, Machado CG, Araujo AS, Lucena-Araujo AR, Bezerra MA. Influence of the beta haplotype and alpha-thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. *Ann Hematol* 2014;93:1123-1129.
13. Cox SE, Makani J, Soka D, L'Esperence V S, Kija E, Dominguez-Salas P, Newton CR, Birch AA, Prentice AM, Kirkham FJ. Haptoglobin, alpha-thalassaemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase polymorphisms and risk of abnormal

- transcranial Doppler among patients with sickle cell anaemia in Tanzania. *Br J Haematol* 2014;165:699-706.
14. Joly P, Garnier N, Kebaili K, Renoux C, Dony A, Cheikh N, Renard C, Ceraulo A, Cuzzubbo D, Pondarre C, Martin C, Pialoux V, Francina A, Bertrand Y, Connes P. G6PD deficiency and absence of alpha-thalassemia increase the risk for cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia. *Eur J Haematol* 2015;.
 15. Connes P, Verlhac S, Bernaudin F. Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2013;161:484-498.
 16. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, Wethers DL, Pegelow CH, Gill FM. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* 1998;91:288-294.
 17. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, Abboud M, Gallagher D, Kutlar A, Nichols FT, Bonds DR, Brambilla D. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med* 1998;339:5-11.
 18. Meier ER, Wright EC, Miller JL. Reticulocytosis and anemia are associated with an increased risk of death and stroke in the newborn cohort of the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Am J Hematol* 2014;89:904-906.
 19. Silva CM, Giovani P, Viana MB. High reticulocyte count is an independent risk factor for cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer* 2011;56:116-121.

20. Meier ER, Fasano RM, Estrada M, He J, Luban NL, McCarter R. Early Reticulocytosis and Anemia Are Associated with Abnormal and Conditional Transcranial Doppler Velocities in Children with Sickle Cell Anemia. *J Pediatr* 2015.
21. Monteiro WM, Val FF, Siqueira AM, Franca GP, Sampaio VS, Melo GC, Almeida AC, Brito MA, Peixoto HM, Fuller D, Bassat Q, Romero GA, Maria Regina FO, Marcus Vinicius GL. G6PD deficiency in Latin America: systematic review on prevalence and variants. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2014;109:553-568.

Supplemental Table I. G6PD molecular analyses: primer combinations, PCR-RFLP reaction conditions and restriction patterns

^a Mutation is inherited together with the G6PD A isoform.

G6PD variant	Reagent	Sequence 5' → 3' / endonuclease	MgCl ₂ concentration	Thermal cycling	Restriction pattern (bp)
1. Isoform A (p.N126D)	Primer-F	TGGCCAGTACGATGATGCAG	1.5 mM	94°C, 10 min	AA 90
rs1050829 (A376G)	Primer-R	GGCCAGGTAGAAGAGGCGGT		94°C, 45 sec; 58°C, 45 sec;	AG 90 + 58 + 32
	Enzyme	5U <i>FokI</i> ; 37°C, for 15 minutes		72°C, 45 sec X 30 cycle	GG 58 + 32
		GTGGCTGTTCCGGGATGGCCTT		72°C, 7 min	
2. A ⁻ (p.V68M) ^a	Primer-F	CTG	2 mM	94°C, 10 min	GG 109
rs1050828 (G202A)	Primer-R	CTTGAAGAAGGGCTCACTCTGT		94°C, 45 sec; 61°C, 45 sec;	GA 109 + 63 + 46
	Enzyme	5U <i>NlaIII</i> ; 37°C, for 15 minutes		72°C, 45 sec X 30 cycle	AA 63 + 46
		TTG		72°C, 7 min	
3. A ⁻ (p.L323P) ^a	Primer-F	TCCCTGCACCCCAACTCAAC	1.5 mM	94°C, 10 min	TT 282
rs76723693 (T968C)	Primer-R	R: CCAGTTCTGCCTTGCTGGGC		94°C, 45 sec; 65°C, 45 sec;	TC 282 + 162 + 120
	Enzyme	5U <i>NciI</i> ; 37°C, overnight		72°C, 45 sec X 30 cycle	CC 162 + 120
				72°C, 7 min	
4. A ⁻ (p.R227L) ^a	Primer-F	ACATGTGGCCCCTGCACCAC	1.5 mM	94°C, 10 min	GG 213 + 29
rs137852328 (G680T)	Primer-R	GTGACTGGCTCTGCCACCCTG		94°C, 45 sec; 69°C, 45 sec;	GC 213 + 115 + 98 + 29
	Enzyme	5U <i>BstNI</i> ; 37°C, overnight		72°C, 45 sec X 30 cycle	CC 115 + 98 + 29
				72°C, 7 min	
5. A ⁻ (Santa Maria; p.D181V) ^a	Primer-F	TGGCCAGTACGATGATGCAG	1.5 mM	94°C, 10 min	AA 891 + 456
rs5030872 (A542T)	Primer-R	GTGACTGGCTCTGCCACCCTG		94°C, 45 sec; 69°C, 45 sec;	AT 1347 + 891 + 456
	Enzyme	10U <i>AhdI</i> ; 37°C, overnight		72°C, 45 sec X 30 cycle	TT 1347
				72°C, 7 min	
6. B ⁻ (Mediterranean; p.S188F)	Primer-F	TGGCCAGTACGATGATGCAG	1.5 mM	94°C, 10 min	CC 516 + 450 + 219 + 162
rs5030868 (C563T)	Primer-R	GTGACTGGCTCTGCCACCCTG		94°C, 45 sec; 69°C, 45 sec;	CT 612 + 516 + 450 + 219 + 162
	Enzyme	7U <i>BseRI</i> ; 37°C, overnight		72°C, 45 sec X 30 cycle	TT 612 + 516 + 219
				72°C, 7 min	
7. B ⁻ (Seattle; p.D282H)	Primer-F	ACATGTGGCCCCTGCACCAC	1.5 mM	94°C, 10 min	GG 312 + 305 + 219 + 201 + 142 + 131 + 9
rs137852318 (G844C)	Primer-R	CCAGTTCTGCCTTGCTGGGC		94°C, 45 sec; 69°C, 45 sec;	GC 447 + 312 + 305 + 219 + 201 + 142 + 131 + 9
	Enzyme	8U <i>Hpy188I</i> ; 37°C, overnight		72°C, 45 sec X 30 cycle	CC 447 + 312 + 219 + 201 + 131 + 9
				72°C, 7 min	

^a Mutation is inherited together with the G6PD A isoform.

11. Artigo 5 – Publicado no periódico *Hemoglobin* DOI: 10.3109/03630269.2016.1149076

Short communication

The natural history of sickle cell/hereditary persistence of fetal hemoglobin in 13 children from the state of Minas Gerais, Brazil

Running head title: sickle cell/hereditary persistence of Hb F

André R. Belisário ^{1,2*}; Rahyssa R. Sales ^{2,3}; Silva, Célia Maria ³; Cibele Velloso-Rodrigues ⁴; and Marcos Borato Viana ²

¹ Centro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais, Fundação Hemominas, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil

² Faculdade de Medicina/NUPAD, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

³ Serviço de Pesquisa, Fundação Hemominas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

⁴ Departamento Básico – Área de Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil

* **Address correspondence to** André Rolim Belisário, Centro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais, Fundação Hemominas; Rua das Goiabeiras, 779, Lagoa Santa, Brazil; Zip Code 33400-000. Phone: +55 (31) 3268.0548. Fax: 55 (31) 3248.9579. E-mail: andrebelisario@yahoo.com.br

Abstract

Children with sickle cell/hereditary persistence of fetal hemoglobin (Hb S/HPFH) have mild clinical phenotype, but some complications have been reported. The natural history of Hb S/HPFH in children from the Minas Gerais state newborn cohort was described. Clinical and hematological data regarding participants' phenotypes were retrieved from medical records. HPFH type 1, 2, and 3 and alpha-thalassemia deletions were detected by gap-PCR. Thirteen children were included, nine (69.2%) had the Hb S/HPFH deletion type 2, and four (30.8%) had deletion type 1; eleven children (84.6%) were $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, and two (15.4%) $\alpha\alpha/-\alpha$ ^{3,7}. The mean concentration of total hemoglobin (Hb) and Hb F was 12.52 ± 0.56 g/dl and $42.31\% \pm 1.97\%$, respectively. Mild microcytosis and hypochromia were observed. We found acute clinical manifestations of sickle cell disease, such as acute chest syndrome and acute pain crisis, in four children; nine (69.2%) children were completely asymptomatic during the follow-up period. All children were classified as having low-risk transcranial Doppler. In conclusion, children with Hb S/HPFH have a mild clinical phenotype of sickle cell disease, although acute clinical manifestations may occur. High Hb F levels and absence of anemia are common hematological characteristics.

Key words

Sickle cell disease; hereditary persistence of fetal hemoglobin; natural history; transcranial Doppler ultrasonography

Introduction

Sickle cell disease (SCD) is an inherited disorder caused by a point mutation at the sixth codon of the β -globin gene (*HBB*:c.20A>T, p.E6V) that is present in homozygosity or associated with another mutated β -globin allele. More than 15 different SCD genotypes have been identified (1). Sickle cell anemia, which is caused by homozygosity of the hemoglobin S (Hb S) allele, is the most common at birth and most severe phenotype, but the severity of the clinical symptoms may range from mild to extreme. The prevalence and clinical phenotype of compound heterozygous forms of SCD (e.g., Hb SC, S β -thalassemia, and SD-Punjab) is highly variable (2). Sickle cell/hereditary persistence of fetal hemoglobin (Hb S/HPFH) is an uncommon genotype of SCD that is usually associated with a very mild clinical phenotype (3). In the Jamaican population, the incidence rate of Hb S/HPFH, estimated through newborn screening, was one case per every 14,000 newborn (4). However, only limited data about Hb S/HPFH are available. In the largest sample so far studied, 30 individuals with Hb S/HPFH showed almost-normal hematological values and an absence of clinical complications attributable to SCD (5). However, Hb S/HPFH may still lead to some complications. Sickle cell retinopathy was found in three out of six patients with Hb S/HPFH (6). Recently, a case report described a 19-year-old Hb S/HPFH patient who developed a massive splenic infarct (7). Therefore, Hb S/HPFH phenotype is not completely understood and warrants further investigation to establish its natural history. Furthermore, there are no data on cerebral blood flow velocities, as measured by transcranial Doppler (TCD), in Hb S/HPFH children worldwide. In this report, the natural history of Hb S/HPFH in children from the Minas Gerais state SCD newborn cohort, in Brazil, was described. In addition, the study aimed to estimate, using TCD, the risk of ischemic stroke in these children.

Methods

Design and subjects

This was a retrospective cohort study involving children with SCD diagnosed by the Newborn Screening Program from the Minas Gerais state, in Brazil. Between January 1999 and December 2008, the Program detected 1,066 children with the Hb FS pattern at birth. Out of these 1,066 children from

all over the state, 554 were followed up at an outpatient care unit of Fundação Hemominas, which is situated in the state capital, Belo Horizonte. Among these 554 children, 440 were included in a study aimed at identifying clinical, hematological, and molecular risk factors for ischemic stroke in children with sickle cell anemia. The reasons for excluding 114 children were: 53 died before the study, 38 were transferred to another outpatient care unit, blood sample was not collected in 17 children, and 6 families did not consent to their children's participation in the study. Molecular analyses to identify Hb S/HPFH genotypes were performed on 26 children with a steady-state fetal hemoglobin (Hb F) relative concentration equal to or greater than 30% after two years of age. The study identified 13 children who were determined to have the S/deletional HPFH genotypes. The remaining children had Hb SS (n=395) or S β -thalassemia (n=32).

The study protocol was approved by institutional review boards (Fundação Hemominas reference number 295, and Universidade Federal de Minas Gerais reference number 154/11). After the purpose of the study was explained, informed written consents were obtained from parents or guardians, and the children's assent was obtained, when appropriate. The study was conducted in accordance with the guidelines set up by the Declaration of Helsinki.

DNA analysis

HPFH 1, 2, and 3 deletions were detected by gap polymerase chain reaction (PCR) as described previously (8). Detection of the α -globin gene's (*HBA*) more common deletions ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, SEA , $--^{FIL}$, $--^{MED}$, $-(\alpha)^{20.5}$, and $--^{THAI}$) was performed by multiplex gap PCR as described previously (9); however, in this study, the primers' annealing temperature was increased to 62°C.

Clinical and hematological data

Clinical and hematological data regarding participants' phenotypes were retrieved from medical records and entered into a dedicated database. Data were reviewed from the children's first clinical appointment, which was prior to 2 months of age, up to December 31, 2014. Variables recorded included identification data, gender, birth date, age, acute pain crisis, acute chest syndrome (ACS), acute splenic sequestration, stroke, other clinical complications, and blood transfusions.

Acute pain crisis was defined as an acute event characterized by diffuse pain occurring in the upper or lower extremities, back, chest, and abdomen, which was related to SCD and required hospitalization (10). ACS was defined as the radiological appearance of a new pulmonary infiltration of

at least one complete lung segment, accompanied by fever and a combination of respiratory symptoms (11). TCD examinations were all made and interpreted by a single expert. The *Stroke Prevention Trial* in the Sickle Cell Anemia study protocol (12) was followed, with pulse TCD and a 2 MHz probe for a full Doppler test (EME TC 2000; Nicolet, Madison, WI, USA).

Total Hb concentration, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), erythrocyte count, white blood cell (WBC), and platelet counts were determined using an electronic cell counter (Coulter T890; Coulter, Hialeah, FL, USA or CELL-DYN Ruby; Abbott Laboratories, Santa Clara, CA, USA). The percentage of Hb F was quantified by Hb electrophoresis (SPIFE kits; Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA) in an alkaline environment. Absolute reticulocyte count was calculated multiplying the relative count on smears stained with brilliant cresyl blue by the erythrocyte count. The quantitative determination of G6PD activity was performed using an enzymatic colorimetric assay (NeoLISA® G6PD; Interscientific Corporation, Hollywood, FL, USA). The arithmetic means of Hb, MCV, MCH, WBC, platelet count, and reticulocyte count were calculated for children after they reached the age of two years and steady-state values were obtained from these calculations. The value at the last exam was considered to be the Hb F steady-state value. Values obtained from tests performed up to 90 days after a blood transfusion and during significant clinical illness (acute pain crisis, ACS, and severe infection) were disregarded in the calculations.

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as means \pm standard deviations, and nominal variables as percentages. The Kolmogorov–Smirnov goodness-fit test was used to evaluate the normal distribution of continuous variables. The unpaired t-test was used to compare different groups for continuous variables that were normally distributed. The nonparametric Mann–Whitney test was used for continuous variables that were not normally distributed. Univariate associations between outcomes and covariates were evaluated using the two-tailed chi-square test or Fisher’s exact test. Statistically significant values were set at $p \leq 0.05$. To exclude a possible bias due to differences in the duration of follow-up, the clinical events (acute pain crisis, ACS, and transfusions) were transformed into rates. The event rate was defined as the absolute number of episodes divided by the duration of follow-up for each child. Statistical analyses were performed with SPSS 17.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Out of the 13 children included in this study, nine (69.2%) had the Hb S/HPFH type 2 genotype (deletion type 2), and four (30.8%) had the Hb S/HPFH type 1 (deletion type 1). The mean follow-up was 10.13 ± 3.52 years (range, 4.29–15.26 years), providing a total of 131.69 patient-years. The children had a mean age of 10.99 ± 3.08 years (range: 6.36–15.51 years), and 7 (53.8%) of them were male. Analysis of *HBA* deletions showed that 11 children (84.6%) were $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, and two (15.4%) $\alpha\alpha/-\alpha$ ^{3,7}.

Hematological data showed that no child had anemia (mean total Hb 12.52 ± 0.56 g/dl). Mild microcytosis and hypochromia were recorded. Furthermore, mild reticulocytosis (mean absolute reticulocyte count $129.98 \times 10^9/L$; mean relative reticulocyte count $> 1.5\%$) was observed in two children with Hb S/HPFH type 2 but not in any children with Hb S/HPFH type 1 (mean absolute reticulocyte count $33.80 \times 10^9/L$; all relative reticulocyte count $< 1\%$). The mean WBC count was normal in all children. As expected, the mean relative concentration of Hb F was very high ($42.31\% \pm 1.97\%$). Children with Hb S/HPFH type 1 had significantly lower mean reticulocyte counts and a trend towards lower WBC when compared to children with Hb S/HPFH type 2 (Table 1). Co-inheritance of alpha-thalassemia did not significantly modify hematological features (data not shown).

Out of 13 children, two (15.4%) suffered from acute pain crisis requiring hospitalization; one of them once, and one of them six times. One (7.7%) suffered one episode of spleen enlargement, for which a two-day hospitalization was required without a transfusion requirement. Hematological tests were not available to confirm this episode as an acute splenic sequestration. No child required a splenectomy. Two (15.4%) children had ACS in this sample; one of them twice, and the other once. Only one child from the sample (HPFH type 2 genotype) required blood transfusions; he received eight transfusions during six hospitalizations due to severe infections, acute pain crisis, and/or acute anemia. Of the 13 children, 12 (92.3%) had at least one valid TCD test. All of them were classified as having low-risk TCD. The overall mean of highest time-averaged mean velocities (TAMMX) in the middle cerebral artery (MCA) was 103.8 ± 13.4 cm/s (range: 77–123 cm/s). No child had a history of stroke, and none required a prophylactic blood transfusion program or hydroxycarbamide therapy. No child died during the follow-up period. All clinical manifestations were restricted to four children (three of the nine with S/HPFH type 2, and one in four with type 1), meaning that nine (69.2%) children were completely asymptomatic during the follow-up period. Clinical event rates were not significantly different between Hb S/HPFH type 1 and Hb S/HPFH type 2 children (Table 1).

Table 1 – Clinical, hematological, and genetic characteristics of children with Hb S/HPFH in Minas Gerais, Brazil

Variables	Hb S/HPFH			P value
	HPFH type 1 n=4	HPFH type 2 n=9	Total n=13	
<i>Gender</i>				
<i>male</i>	2 (28.6%)	5 (71.4%)	7 (100%)	1.00 ^a
<i>female</i>	2 (33.3%)	4 (66.7%)	6 (100%)	
<i>Age (years)</i>	11.12±3.93	10.93±2.91	10.99±3.08	0.92 ^b
<i>Clinical variables – absolute number (rate per year of follow-up)</i>				
Acute chest syndrome rate	2 (0.06±0.12)	1 (0.008±0.023)	3 (0.024±0.068)	0.71 ^c
Acute pain crisis rate	1 (0.030±0.060)	6 (0.050±0.150)	7 (0.044±0.126)	0.83 ^c
Transfusion rate	0 (0.000)	8 (0.067±0.200)	8 (0.046±0.166)	0.83 ^c
<i>Laboratorial variables</i>				
Hb (g/dl)	12.63±0.40	12.47±0.63	12.52±0.56	0.66 ^b
MCV (fl)	77.20±2.32	78.13±3.56	77.85±3.16	0.64 ^b
MCH (pg)	25.30±1.44	25.50±1.74	25.44±1.59	0.85 ^b
WBC (10 ⁹ /L)	8.53±1.50	9.97±1.41	9.52±1.53	0.12 ^b
Platelet (10 ⁹ /L)	316.53±28.73	302.01±46.73	306.48±41.36	0.58 ^b
Absolute reticulocyte count (10 ⁹ /L)	33.80±8.71	78.34±32.36	64.63±34.28	0.023^b
Hb F (%)	43.25±1.89	41.89±1.97	42.31±1.97	0.27 ^b
G6PD activity (U/g Hb)	11.79±2.37	11.36±3.25	11.55±2.73	0.83 ^b
TAMMV (n=12)	98.75±16.88	106.71±11.35	103.82±13.38	0.37 ^b
<i>Genetic factors</i>				
HBA deletion status				
αα/αα	3 (27.3%)	8 (72.7%)	11 (100%)	1.00 ^a
αα/-α ^{3,7}	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	

^a Fisher's exact test

^b unpaired t-test

^c Mann-Whitney U test

Discussion

Our study confirmed the mild phenotype of Hb S/HPFH with nearly normal hematological features, but highlighted the possibility of severe clinical manifestations of SCD. In addition, we demonstrated that TCD was normal in all children.

The phenotype of Hb S/HPFH has been considered very mild (3) although few studies of clinical presentation in this subtype of SCD have been reported. Cohort studies, such as the present one, are lacking. Edington and Lehmann first described the characteristics of two adults who were

thought to be homozygous for Hb S. Although reporting some pain crises and other mild manifestations, they were considered to have a benign clinical course. The high Hb F and the generation of children without Hb S led the authors to suspect that the patients did not have the Hb SS genotype (13). Shortly thereafter, Jacob and Raper (14) described four cases of Hb S/HPFH. Again, despite the benign clinical course, episodes of pain crises were reported in three out of four cases. Conley et al. (15) described twenty patients who were double heterozygous for Hb S/HPFH. In general, these patients showed excellent health and a very mild hemolytic anemia as measured by Cr⁵¹ half-life. However, an aseptic necrosis of the femoral head and a mild hemiparesis cases were reported, showing that these patients may have severe clinical manifestations attributable to SCD. Rubin and Rowley (16) described a case of twins with Hb S/HPFH misdiagnosed as sickle cell anemia during newborn screening. One of them had been hospitalized twice due to aseptic meningitis and bilateral otitis media at the ages of four and eight months, respectively. Talbot et al. (6) reported peripheral retinal vessel occlusion in three out of six patients with Hb S/HPFH that had been diagnosed through clinical and laboratory data without molecular analysis; one of them had developed chorioretinal anastomosis. In the largest study on Hb S/HPFH, the authors reported an absence of clinical manifestations in 30 Hb S/HPFH cases, all confirmed by molecular analysis to be either type 1 or 2 (5). The outcome of patients from that report was notably better than that from our cohort. Intriguingly, we found acute clinical manifestations of SCD in children with Hb S/HPFH, such as ACS, and acute pain crisis, in four out of 13 children. The proportion of HPFH type 1 patients was very similar to ours. In contrast, all children in the present study were followed up at the same institution and those from Ngo et al. were derived from many institutions. Both studies were retrospective, but the criteria for the definition of clinical events are possibly more uniform when conducted in a single institution. These data suggest that other genetic and environmental factors may influence the phenotypic variability of Hb S/HPFH. Even though the Hb F is homogeneously distributed among all red blood cells in patients with Hb S/HPFH (17), this distribution may vary among them, originating different degrees of clinical severity as observed in our study.

Although the difference was not statistically significant, children with S/HPFH type 2 had higher acute pain crisis, and transfusion rates than children with S/HPFH type 1. Reticulocyte counts were significantly higher in children with S/HPFH type 2. Other hematological data, except for high levels of Hb F, were nearly normal in both types. Similar results have been reported in previously published studies (5, 18).

In this study, we report a case of spleen enlargement in a child with Hb S/HPFH type 2. The diagnosis of acute splenic sequestration was not confirmed because hematological tests were not

performed. The child was admitted to a hospital because, according to the records, she was not feeling well and had an enlarged spleen, which had never been recorded before and was not observed on subsequent clinical visits. The hospitalization lasted two days. No laboratory test was performed, because the hospital had limited resources and was far from the capital. This event is compatible with other cases of sickle cell spleen disease reported in patients with Hb S/HPFH, including pain of splenic origin (14), palpable spleen (15), and massive splenic infarction (7).

There were no conditional or high-risk TCD tests among our children, suggesting a very low stroke risk in Hb S/HPFH patients. TCD velocities (mean TAMMV 103.82 cm/s at MCA) were substantially lower than those reported in Hb SS children and similar to those reported in Hb SC children. The mean TAMMV was 129 ± 22 cm/s in children with Hb SS and low-risk TCD from the cohort of the Medical College of Georgia (19). The mean TAMMV for Hb SC children from London was 94 cm/s (20). Children without SCD have a mean TAMMV of about 90 cm/s (21). The lower TAMMV levels observed in our study may certainly be attributed to an absence of anemia in children with Hb S/HPFH, and the absence of narrowing or occlusion of cerebral vessels. To the best of our knowledge, this is the first study to report the results of TCD screening in children with Hb S/HPFH. Additional studies using neuroimaging technologies are required to confirm the absence of cerebrovascular disease risk in children with Hb S/HPFH.

The current analysis has some limitations. Given that the reported cases are children, long-term complications cannot be predicted. Owing to the small number of patients, the present report may not completely represent this rare subtype of SCD. Due to a possible loss of milder cases, our study may have suffered from selection bias, overestimating the clinical severity of Hb S/HPFH. Furthermore, we used medical records as the source of retrospective data, which were generated for clinical follow-up and not for research.

In conclusion, children with Hb S/deletional HPFH have a mild clinical phenotype of SCD, although acute clinical manifestations may occur. High Hb F levels and absence of anemia are common hematological characteristics. Type 1 HPFH deletion seems to lead to an even milder benign course than type 2.

Acknowledgments

The authors acknowledge all subjects and parents for their cooperation in the study. The authors also thank the financial support of Fundação Hemominas, Newborn Screening Program (Nupad-UFMG), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG; grant # PPM-00266-13), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant # 304530/2011-5), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

References

1. Rees DC, Gibson JS. Biomarkers in sickle cell disease. *Br J Haematol* 2012;156(4):433-445.
2. Steinberg MH, Sebastiani P. Genetic modifiers of sickle cell disease. *Am J Hematol* 2012;87(8):795-803.
3. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010;376(9757):2018-2031.
4. Serjeant GR, Serjeant BE, Forbes M, Hayes RJ, Higgs DR, Lehmann H. Haemoglobin gene frequencies in the Jamaican population: a study in 100,000 newborns. *Br J Haematol* 1986;64(2):253-262.
5. Ngo DA, Aygun B, Akinsheye I, Hankins JS, Bhan I, Luo HY, Steinberg MH, Chui DH. Fetal haemoglobin levels and haematological characteristics of compound heterozygotes for haemoglobin S and deletional hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Br J Haematol* 2012;156(2):259-264.
6. Talbot JF, Bird AC, Serjeant GR. Retinal changes in sickle cell/hereditary persistence of fetal haemoglobin syndrome. *The British journal of ophthalmology* 1983;67(11):777-778.
7. Whyte D, Forget B, Chui DH, Luo HY, Pashankar F. Massive splenic infarction in an adolescent with hemoglobin S-HPFH. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60(7):E49-51.

8. Craig JE, Barnetson RA, Prior J, Raven JL, Thein SL. Rapid detection of deletions causing delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. *Blood* 1994;83(6):1673-1682.
9. Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood* 2001;98(1):250-251.
10. Sarray S, Saleh LR, Lisa Saldanha F, Al-Habboubi HH, Mahdi N, Almawi WY. Serum IL-6, IL-10, and TNFalpha levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. *Cytokine* 2015;72(1):43-47.
11. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet* 2004;364(9442):1343-1360.
12. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, Abboud M, Gallagher D, Kutlar A, Nichols FT, Bonds DR, Brambilla D. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med* 1998;339(1):5-11.
13. Edington GM, Lehmann H. Expression of the sickle-cell gene in Africa. *British medical journal* 1955;1(4925):1308-1311.
14. Jacob GF, Raper AB. Hereditary persistence of foetal haemoglobin production, and its interaction with the sickle-cell trait. *Br J Haematol* 1958;4(2):138-149.
15. Conley CL, Weatherall DJ, Richardson SN, Shepard MK, Charache S. Hereditary persistence of fetal hemoglobin: a study of 79 affected persons in 15 Negro families in Baltimore. *Blood* 1963;21:261-281.
16. Rubin EM, Rowley PT. Sickle cell trait/hereditary persistence of fetal hemoglobin trait. Misdiagnosis as sickle cell anemia by newborn screening. *American journal of diseases of children* 1979;133(12):1248-1250.
17. Steinberg MH, Chui DH, Dover GJ, Sebastiani P, Alsultan A. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? *Blood* 2014;123(4):481-485.
18. Murray N, Serjeant BE, Serjeant GR. Sickle cell-hereditary persistence of fetal haemoglobin and its differentiation from other sickle cell syndromes. *Br J Haematol* 1988;69(1):89-92.
19. Adams R, McKie V, Nichols F, Carl E, Zhang DL, McKie K, Figueroa R, Litaker M, Thompson W, Hess D. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med* 1992;326(9):605-610.
20. Deane CR, Goss D, O'Driscoll S, Mellor S, Pohl KR, Dick MC, Height SE, Rees DC. Transcranial Doppler scanning and the assessment of stroke risk in children with HbSC [corrected] disease. *Archives of disease in childhood* 2008;93(2):138-141.

21. Adams RJ. Big strokes in small persons. Arch Neurol 2007;64(11):1567-1574.

12. Artigo 6

Interleukin-10 haplotypes do not predict ischemic stroke in a newborn cohort of 395 children with sickle cell anemia

Belisário, André Rolim ^{a,b*}; Rodrigues, Rahyssa Sales ^c; Toledo, Nayara Evelin ^c; Velloso-Rodrigues, Cibele ^d; Silva, Célia Maria ^c; and Viana, Marcos Borato ^b

^a Centro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais, Fundação Hemominas, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil

^b Faculdade de Medicina/NUPAD, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

^c Serviço de Pesquisa, Fundação Hemominas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

^d Departamento Básico – Área de Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), campus Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil

***Correspondence:** André Rolim Belisário, Centro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais, Fundação Hemominas, Rua das Goiabeiras, 779, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil; Zip Code 33400-000. Phone: +55 (31) 3268.0548. Fax: 55 (31) 3248.9579. E-mail: andrebelisario@yahoo.com.br

Abstract

Objectives: Stroke is a severe complication of sickle cell anemia (SCA). Inflammatory processes are involved in the etiology of stroke in children with SCA. However, the pathogenetic mechanisms are unknown. The aim of this study was to evaluate the influence of interleukin-10 haplotypes on the risk of clinical ischemic stroke and high-risk transcranial Doppler (TCD) in 395 children with SCA from the state of Minas Gerais, in Brazil. **Methods:** *IL10* haplotypes were determined by PCR-RFLP and sequencing. Clinical data were retrieved from the children's records. **Results:** There was no statistically significant difference in the frequencies of polymorphisms and haplotypes between children with and without clinical ischemic stroke or children with or without high-risk TCD. **Discussion:** Our data are consistent with a previous report that showed an absence of association between IL-10 plasma levels and high-risk TCD velocity in children with SCA. **Conclusion:** *IL10* haplotypes were not associated with the risk of clinical ischemic stroke or high-risk TCD in children with SCA from the state of Minas Gerais, Brazil.

Key words

Sickle cell anemia; Stroke; Polymorphism; Interleukin-10; Transcranial Doppler ultrasound

Introduction

Cerebrovascular disease is a severe complication of sickle cell anemia (SCA), affecting almost one-half of the children with SCA by the age of fourteen.¹ The phenotype of SCA is extremely variable, and stroke occurs in 11% of individuals under 20 years of age without preemptive treatment.² Despite the fact that transcranial Doppler (DTC) ultrasonography is very useful,³ there is a need to develop more accurate prognostic tools to identify children who are at the highest risk of developing a stroke.⁴ Inflammatory processes play an important role in the development of occlusive disease at the circle of Willis⁵ and are clearly involved in the etiology of stroke in children with SCA.⁶ Polymorphisms in cytokine or cytokine receptors genes have been shown to modulate the occurrence of stroke in children with SCA.⁷⁻⁹ Interleukin 10 (IL-10) is a vital immunoregulatory cytokine involved in both the immune response and inflammation. *IL10* gene polymorphisms in the promoter region (known as -1082 G/A, -819 T/C, and -592 A/C) form haplotypes that are linked to different expression levels of this cytokine.¹⁰ In recent years, reports have demonstrated that *IL10* haplotypes are associated with many aspects of different diseases and conditions, including survival and relapse rate in resected non-small cell lung cancer,¹¹ systemic lupus erythematosus,¹² asthma,¹³ and inhibitor development in hemophilia A.¹⁴ A recent report has shown an association between reduced IL-10 levels and the frequency, type, severity, and duration of vaso-occlusive crises in children with SCA,¹⁵ suggesting a possible influence of IL-10 on the pathophysiology of stroke. Based on these data, we hypothesized that *IL10* promoter polymorphisms could influence the occurrence of stroke in children with SCA.

Method

This was a retrospective cohort study that included 395 children with SCA from the Minas Gerais state in Brazil. Children who were born between January 1999 and December 2008 and followed-up at “Fundação Hemominas” in Belo Horizonte until June 2015 were recruited from a newborn cohort of 472 subjects with an Hb FS electrophoretic profile. Of the 472 children, 32 with S β -thalassemia genotype, 13 with HbS/hereditary persistence of fetal hemoglobin, one child with hemorrhagic stroke, and 31 who could not be reached during the study or did not consent to participation were excluded. The study protocol was approved by the individual institutional review boards (Fundação Hemominas #295 and Universidade Federal de Minas Gerais #154/11); informed written consent was obtained from parents or guardians, and children’s assent was obtained, when appropriate. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki guidelines.

Genomic DNA extraction from blood samples was carried out using a commercial kit (QIAamp, DNA Blood Mini Kit; Qiagen, Hilden, Germany). To confirm the presence of SCA, the β^S allele genotype of all children was confirmed by PCR–RFLP analysis as previously described.¹⁶ *IL10* promoter polymorphisms, c.–627 A > C (rs1800872; known as –592 A > C), c.–854 T > C (rs1800871; known as –819 T > C), and c.–1117 A > G (rs1800896; known as –1082 A > G), were genotyped through PCR–RFLP, as previously described.^{17,18} At least 5% of the samples were randomly selected for DNA sequencing to confirm PCR–RFLP results. DNA sequencing was done in ABI Prism 3130 Analyzer (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA), using standard protocols. Due to complete linkage disequilibrium between rs1800872 (–592 A > C) and rs1800871 (–819 T > C) polymorphisms,¹⁹ only 70 children were genotyped for the rs1800871 polymorphism and in

all the linkage between those two polymorphisms was detected. Haplotypes of the SNPs were coded in the following order: rs1800896, rs1800871, and rs1800872 (for example, GCC).

Two outcomes were analyzed: Clinical ischemic stroke and high-risk TCD. Clinical ischemic stroke was defined as a neurological deficit lasting more than 24 h and/or history of transient ischemic attack (TIA).² The diagnosis was confirmed by imaging assessments in all cases. Intracranial hemorrhage was not included in the category of stroke. High-risk TCD was defined as a time-averaged mean of the maximum velocity (TAMMX) ≥ 200 cm/s in the internal carotid or middle cerebral artery as originally defined by STOP investigators.²⁰ Children who had suffered clinical ischemic stroke, as well as those for whom TCD screening was inadequate, were excluded from the second analysis. For subjects who underwent multiple TCD tests, only the final test was included in the analysis. For children undergoing chronic transfusion therapy, treatment with hydroxyurea, or bone marrow transplantation, the result from the last TCD exam prior to the initiation of therapy was included in the analysis.

Nominal variables were expressed as percentages. Univariate association between outcomes and single polymorphisms or haplotypes were evaluated using two-tailed chi-square or Fisher's exact test. Initially, the influence of each polymorphism alone was verified. Subsequently, only children with the homozygous form of each haplotype (GCC/GCC, ACC/ACC, or ATA/ATA) were tested. Finally, children were grouped into haplotypes defined as high (GCC/GCC), intermediate (GCC/ACC and GCC/ATA) or low (ACC/ACC, ATA/ATA, and ATA/ACC) levels of IL-10 production.²¹ The cumulative probability of outcomes was estimated by using the Kaplan–Meier method [function (1-Survival)] and the log rank test was used to compare different subgroups. Birth date

determined entry into the study program. Observations were censored in the event of a patient receiving chronic prophylactic blood transfusions or hydroxyurea, a patient undergoing bone marrow transplantation, death from causes unrelated to outcomes, or no outcome event until June 2015 (end of study). Statistical significance was defined as P values ≤ 0.05 . Statistical analyses were performed with SPSS 17.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

During the study, twenty-six (6.6%; 95% CI: 4.14–9.03) children had a clinical ischemic stroke; 19 (4.8%) had an overt stroke, 3 (0.7%) had TIA, and 4 (1%) had both overt stroke and TIA. Twenty-nine (8.6%; 95% CI: 5.59–11.57) out of 338 children had high-risk TCD; 57/395 (14.4%) children had clinical ischemic stroke or inadequate TCD and were excluded from the analysis for high-risk TCD. The cumulative probability of clinical ischemic stroke by the age of 8.0 years was 7.4% (95% CI: 4.66%–10.14%), and the cumulative probability of high-risk TCD by the age of 11.5 years was 14.2% (95% CI: 8.91%–19.49%).

Analysis of *IL10* haplotypes in our cohort showed that 99 (25.1%) children were GCC/ATA, 85 (21.5%) ACC/ATA, 79 (20%) GCC/ACC, 50 (12.7%) GCC/GCC, 47 (11.9%) ATA/ATA, and 34 (8.6%) were ACC/ACC. One (0.3%) child had an uncommon heterozygous haplotype (GCC/GTA). There was no significant difference in the frequencies of polymorphisms and haplotypes between children with and without clinical

ischemic stroke (Table 1). Similar results were obtained between children with and without high-risk TCD (Table 2).

Table 1 – *IL10* polymorphisms and haplotypes among SCA children with and without clinical ischemic stroke

Polymorphism	Clinical Ischemic Stroke			P value	Odds ratio	95% CI
	Yes (n=26)	No (n=369)	Total (n=395)			
<i>IL10</i> rs1800896 (A or G)*						
AA	9 (5.6%)	152 (94.4%)	161 (100%)	0.503 ^a		
Ag	13 (7.1%)	170 (92.9%)	183 (100%)	0.544 ^{b,c}	1.32	0.58-3.05
gg	4 (7.8%)	47 (92.2%)	51 (100%)	0.704 ^{b,d}	1.25	0.41-3.77
<i>IL10</i> rs1800871 (C or T)*						
CC	12 (7.4%)	150 (92.6%)	162 (100%)	0.297 ^a		
Ct	13 (7.0%)	173 (93%)	186 (100%)	0.681 ^{b,c}	0.80	0.36-1.78
tt	1 (2.1%)	46 (97.9%)	47 (100%)	0.342 ^{b,d}	0.28	0.04-2.12
<i>IL10</i> rs1800872 (A or C)*						
CC	12 (7.4%)	150 (92.6%)	162 (100%)	0.297 ^a		
Ca	13 (7%)	173 (93%)	186 (100%)	0.681 ^{b,c}	0.80	0.36-1.78
aa	1 (2.1%)	46 (97.9%)	47 (100%)	0.342 ^{b,d}	0.28	0.04-2.12
<i>IL10</i> haplotypes						
High	4 (8%)	46 (92%)	50 (100%)	0.428 ^a		
Intermediate	13 (7.3%)	165 (92.7%)	178 (100%)			
Low	9 (4.8%)	157 (93.4%)	166 (100%)			

^aX² linear-by-linear association;

^bFisher's exact test;

^cdominant association (XX versus Xx or xx)

^drecessive association (XX or Xx versus xx)

* Minor alleles, as recorded by dbSNP, are represented by lowercase letters.

Table 2 – *IL10* polymorphisms and haplotypes among SCA children with and without high-risk transcranial Doppler

Polymorphism	High-risk TCD			P value	Odds ratio	95% CI
	Yes (n=29)	No (n=309)	Total (n=338)			
<i>IL10</i> rs1800896 (A or G)*						
AA	7 (5.1%)	130 (94.9%)	137 (100%)	0.151 ^a		
Ag	18 (11.5%)	139 (88.5%)	157 (100%)	0.075 ^{b,c}	2.28	0.95-5.50
gg	4 (9.1%)	40 (9.1%)	44 (100%)	0.78 ^{b,d}	1.08	0.36-3.25
<i>IL10</i> rs1800871 (C or T)*						
CC	15 (10.7%)	125 (89.3%)	140 (100%)	0.311 ^a		
Ct	11 (7.0%)	146 (93%)	157 (100%)	0.244 ^{b,c}	0.63	0.30-1.36
tt	3 (7.3%)	38 (92.7%)	41 (100%)	1.00 ^{b,d}	0.82	0.24-2.85
<i>IL10</i> rs1800872 (A or C)*						
CC	15 (10.7%)	125 (89.3%)	140 (100%)	0.311 ^a		
Ca	11 (7.0%)	146 (93%)	157 (100%)	0.244 ^{b,c}	0.63	0.30-1.36
aa	3 (7.3%)	38 (92.7%)	41 (100%)	1.00 ^{b,d}	0.82	0.24-2.85
<i>IL10</i> haplotypes						
High	4 (9.3%)	39 (90.7%)	43 (100%)	0.198 ^a		
Intermediate	17 (11.2%)	135 (88.8%)	152 (100%)			
Low	8 (5.6%)	134 (94.4%)	142 (100%)			

^aX² linear-by-linear association;

^bFisher's exact test;

^cdominant association (XX or Xx versus xx)

^drecessive association (XX or Xx versus xx)

* Minor alleles, as recorded by dbSNP, are represented by lowercase letters.

The cumulative probabilities of clinical ischemic stroke or high-risk TCD for *IL-10* expression haplotype groups were not significantly different (Figure 1A and 1B, respectively). Similar results were obtained when only children that were homozygous for each haplotype were tested (Figure 1C and 1D).

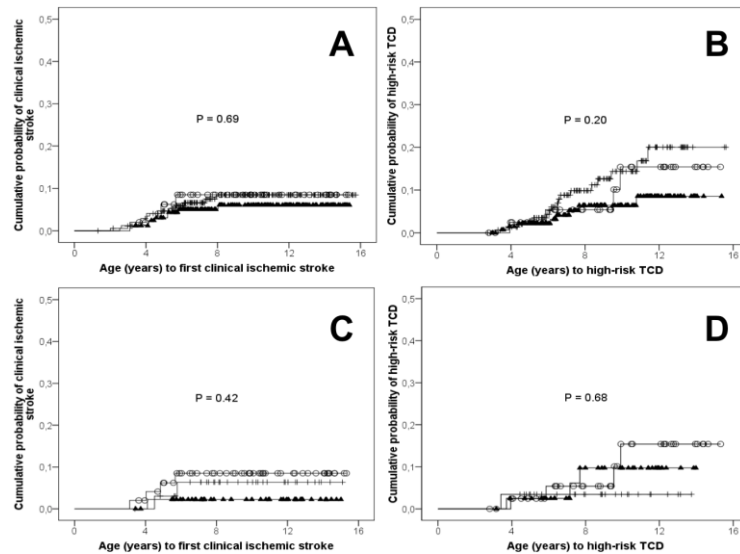


Figure 1 – Cumulative probability of cerebrovascular complications according to *IL10* expression haplotypes. **(A)** Cumulative probability of clinical ischemic stroke in children with Hb SS according to *IL10* haplotypes linked with *IL10* expression. (○) high, (+) intermediate, and, (▲) low *IL10* expression (P = 0.69). **(B)** Cumulative probability of high-risk transcranial Doppler in children with HbSS according to *IL10* haplotypes linked with *IL10* expression. (○) high, (+) intermediate, and, (▲) low *IL10* expression (P = 0.20). **(C)** Cumulative probability of clinical ischemic stroke in children with HbSS according to homozygous *IL10* haplotypes. (○) GCC/GCC, (+) ACC/ACC and, (▲) ATA/ATA genotype (P = 0.42). **(D)** Cumulative probability of high-risk transcranial Doppler in children with HbSS according to homozygous *IL10* haplotypes. (○) GCC/GCC, (+) ACC/ACC and, (▲) ATA/ATA genotype (P = 0.68).

Discussion

This is the first report to evaluate the influence of *IL10* haplotypes on the risk of cerebrovascular disease in children with SCA. Contrary to our initial hypothesis, this study showed no association between *IL10* haplotypes and clinical ischemic stroke or high-risk TCD in children with SCA.

Substantial advances in the past years have established the natural history of stroke in individuals with SCA² and have enabled early identification and treatment of children who are at the highest risk.²⁰ However, the pathophysiology of ischemic stroke is not completely understood. Many candidate genes and polymorphisms have been associated with stroke in children with SCA.^{8,9,22-24} The combination of the *TNFA* -308 GG genotype and *IL4R* 503P variant was significantly associated with a predisposition for stroke in large vessels, determined by the analyses of children in the newborn cohort as part of the Cooperative Study of Sickle Cell Disease (CSSCD).⁹ The rs284875 polymorphism located in the *TGFBR3* gene was associated²³ and validated⁸ as a risk factor for stroke development in individuals with SCA. Recently, we proposed an association between the *TNFA* -308A allele and stroke in children with SCA.⁷

Polymorphisms in cytokine or cytokine receptors genes may either up or downregulate cytokine levels and might play an important role in physiopathology of some diseases. However, our results indicate that promoter polymorphisms in the *IL10* gene are not associated with clinical ischemic stroke or high-risk TCD susceptibility in children with SCA. Our data are consistent with a previous report from a cross-sectional nested prospective study that showed an absence of association between IL-10 plasma levels and high-risk TCD velocity in children with SCA.²⁵ Thus, the *IL10* signaling pathway might not be a viable target for pharmacological, intervention, prevention or treatment of stroke in SCA.

Due to the relatively small number of clinical ischemic stroke and high-risk TCD events, the statistical power in our study may have been insufficient to robustly analyze the association of the *IL10* polymorphisms and haplotypes with the risk of these events. Additionally, the use of medical records as the sole source of retrospective data may have placed further limitations on the possible conclusions of our study.

In summary, our results do not support the hypothesis that *IL10* haplotypes are associated with the risk of clinical ischemic stroke or high-risk TCD in children with SCA. Further larger scale studies are warranted to confirm the absence of association between *IL10* haplotypes and stroke susceptibility in children with SCA.

References

1. Bernaudin F, Verlhac S, Arnaud C, Kamdem A, Chevret S, Hau I, et al. Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. *Blood*. 2011;117(4):1130-40; quiz 436.
2. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood*. 1998;91(1):288-94.
3. Adams R, McKie V, Nichols F, Carl E, Zhang DL, McKie K, et al. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1992;326(9):605-10.
4. Jordan LC, Casella JF, Debaun MR. Prospects for primary stroke prevention in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2012;157(1):14-25.
5. Chang Milbauer L, Wei P, Enestein J, Jiang A, Hillery CA, Scott JP, et al. Genetic endothelial systems biology of sickle stroke risk. *Blood*. 2008;111(7):3872-9.
6. Adams RJ, McKie VC, Carl EM, Nichols FT, Perry R, Brock K, et al. Long-term stroke risk in children with sickle cell disease screened with transcranial Doppler. *Ann Neurol*. 1997;42(5):699-704.
7. Belisario AR, Nogueira FL, Rodrigues RS, Toledo NE, Cattabriga AL, Velloso-Rodrigues C, et al. 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*. 2015;54:44-50.
8. Flanagan JM, Frohlich DM, Howard TA, Schultz WH, Driscoll C, Nagasubramanian R, et al. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood*. 2011;117(24):6681-4.

9. Hoppe C, Klitz W, Cheng S, Apple R, Steiner L, Robles L, et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood*. 2004;103(6):2391-6.
10. Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. *Transplant immunology*. 1998;6(3):193-7.
11. Wang YC, Sung WW, Wu TC, Wang L, Chien WP, Cheng YW, et al. Interleukin-10 haplotype may predict survival and relapse in resected non-small cell lung cancer. *PLoS one*. 2012;7(7):e39525.
12. Palafox-Sanchez CA, Oregon-Romero E, Salazar-Camarena DC, Valle YM, Machado-Contreras JR, Cruz A, et al. Association of interleukin-10 promoter haplotypes with disease susceptibility and IL-10 levels in Mexican patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental medicine*. 2014.
13. Zheng XY, Guan WJ, Mao C, Chen HF, Ding H, Zheng JP, et al. Interleukin-10 promoter 1082/-819/-592 polymorphisms are associated with asthma susceptibility in Asians and atopic asthma: a meta-analysis. *Lung*. 2014;192(1):65-73.
14. Chaves D, Belisario A, Castro G, Santoro M, Rodrigues C. Analysis of cytokine genes polymorphism as markers for inhibitor development in haemophilia A. *International journal of immunogenetics*. 2010;37(2):79-82.
15. Sarray S, Saleh LR, Lisa Saldanha F, Al-Habboubi HH, Mahdi N, Almawi WY. Serum IL-6, IL-10, and TNFalpha levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. *Cytokine*. 2015;72(1):43-7.
16. Belisario AR, Martins ML, Brito AM, Rodrigues CV, Silva CM, Viana MB. beta-globin gene cluster haplotypes in a cohort of 221 children with sickle cell anemia or Sbeta-thalassemia and their association with clinical and hematological features. *Acta Haematol*. 2010;124(3):162-70.
17. Johnson VJ, Yucesoy B, Luster MI. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology. *Cytokine*. 2004;27(6):135-41.
18. Hoebee B, Bont L, Rietveld E, van Oosten M, Hodemaekers HM, Nagelkerke NJ, et al. Influence of promoter variants of interleukin-10, interleukin-9, and tumor necrosis factor-alpha genes on respiratory syncytial virus bronchiolitis. *The Journal of infectious diseases*. 2004;189(2):239-47.
19. Shin HD, Park BL, Kim LH, Jung JH, Kim JY, Yoon JH, et al. Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *Human molecular genetics*. 2003;12(8):901-6.
20. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med*. 1998;339(1):5-11.
21. Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology*. 1999;30(2):526-30.
22. Hoppe C, Cheng S, Grow M, Silbergleit A, Klitz W, Trachtenberg E, et al. A novel multilocus genotyping assay to identify genetic predictors of stroke in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2001;114(3):718-20.
23. Sebastiani P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT, Steinberg MH. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. *Nat Genet*. 2005;37(4):435-40.

24. Flanagan JM, Sheehan V, Linder H, Howard TA, Wang YD, Hoppe CC, et al. Genetic mapping and exome sequencing identify 2 mutations associated with stroke protection in pediatric patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2013;121(16):3237-45.
25. Hyacinth HI, Gee BE, Adamkiewicz TV, Adams RJ, Kutlar A, Stiles JK, et al. Plasma BDNF and PDGF-AA levels are associated with high TCD velocity and stroke in children with sickle cell anemia. *Cytokine*. 2012;60(1):302-8.

13. Artigo 7

Original article

Identification of beta-thalassemia mutations in children with sickle cell/beta-thalassemia from the state of Minas Gerais, Brazil

Running head title: Beta-thalassemia mutations in sickle cell disease

Belisário, André Rolim^{1,2*}; Rodrigues, Rahyssa Sales³; Velloso-Rodrigues, Cibele⁴; and Viana, Marcos Borato²

¹Centro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais, Fundação Hemominas, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil

²Faculdade de Medicina/NUPAD, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³Serviço de Pesquisa, Fundação Hemominas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁴Departamento Básico – Área de Saúde, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil

***Corresponding author at:** Centro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais, Fundação Hemominas, Rua das Goiabeiras, nº 779, Lagoa Santa, Zip Code 33400-000, Brazil. Fax: 55 (31) 3248.9579.

Abstract

Sickle cell/beta-thalassemia (S β -thal) is a subtype of sickle cell disease showing considerable variation in clinical severity. Evidences support that differences in the production of Hb A and severity occurs with different beta-thalassemia mutation. The objective of this study was to identify the β -thal mutations causing S β -thal in the newborn cohort of Minas Gerais state, Brazil. The molecular analysis was performed by DNA sequencing. Out of 54 S β -thal children, 14 (25.9%) children had the codon 39 (C>T) mutation, 12 (22.2%) had IVS-I-1 (G>A), eight (14.8%) had IVS-I-6 (T>C), five (9.3%) had -29 (A>G TATA box), three (5.6%) had IVS-II-1 (G>A), three (5.6%) had IVS-I-110 (G>A), two (3.7%) had -92 (C>T), two (3.7%) had IVS-II-844 (C>A) and IVS-II-839 (T>C) in *cis* mutations, two (3.7%) had IVS-I-5 (G>A), one (1.9%) had -88 (C>T), one (1.9%) had poly A signal (T>C), and one child (1.9%) had IVS-I-2 (T>C) mutation. Analysis of α -globin gene deletions showed that 44 (81.5%) children were $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, nine (16.7%) $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ and one (1.9%) $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$. The Minas Gerais state is the second most heterogeneous state in Brazil in terms of β -thal mutations and has a relatively different molecular pattern when compared to other Brazilian regions.

Key words: Sickle cell disease, β^+ -thalassemia (β^+ -thal), β^0 -thalassemia (β^0 -thal), Mutation

Introduction

Sickle cell disease (SCD) is one of the most common monogenic disorders worldwide. It is caused by a point mutation in the β -globin gene (*HBB*:c.20A>T, p.E6V) leading to a multisystemic disease. Acute episodes and progressive organ damage are characteristic (1). In Brazil, SCD is considered an important public health problem. In the state of Minas Gerais, southeastern of Brazil, the incidence rate of SCD (SS, SC, S β -thalassemia, and SD genotypes) estimated by the Newborn Screening Program (NSP-MG) is one case every 1,400 newborns (2). Unpublished data from NSP-MG based on isoelectric focalization (IEF) screening confirmed by molecular biology (629 children born between 2010-2013), disclosed that the relative frequencies of each subtype of SCD in the state of Minas Gerais are: Hb SS, 328 cases (52.4%); Hb SC, 253 cases (40.4%); S β^+ -thalassemia (S β^+ -thal), 21 cases (3.4%); S β^0 -thalassemia (S β^0 -thal), 19 cases (3%); and SD, 5 cases (0.8%).

The co-inheritance of the β^S allele and a β -thalassemia (β -thal) mutation leads to a subtype of SCD (S β -thal) showing considerable variation in clinical severity (3). This variation largely depends on the β -thal molecular mutation and its impact on the degree of Hb A synthesis. The complete inactivation of one of the *HBB* genes by a β -thal mutation results in S β^0 -thal and clinical severity tends to be similar to sickle cell anemia (4). On the other hand, the β -thal mutation may cause reduction of the synthesis of Hb A, resulting in S β^+ -thal individuals with a wide spectrum of clinical severity (3). Therefore, the identification of the β -thal mutation causing S β -thal may contribute to an appropriate clinical patient management and genetic counseling.

There are almost 300 different β -thal mutations characterized worldwide, most of them caused by single substitution of nucleotides (5). Considerable heterogeneity of β -thal mutations has been reported in different regions of Brazil, reflecting the migration of different ethnic population to and within the country, and the intensity of miscegenation (6-16). However, the genetic profile of β -thal in the state of Minas Gerais is unknown. Therefore, we performed a descriptive study and aimed to identify the β -thal mutations causing S β -thal in the cohort of children diagnosed by the NSP-MG, Brazil.

Material and Methods

Patients

This is a descriptive study involving children from the Minas Gerais state SCD newborn cohort, Brazil. Patients were recruited at the outpatient care unit of Hemominas Foundation, which is situated in the state capital, Belo Horizonte. Children born between 1997 and 2013 with results of neonatal screening and complementary tests suggesting $S\beta^+$ -thal or $S\beta^0$ -thal were included.

The study protocol was approved by the Institutional Review Board. Written informed consent was obtained from parents or guardian of every child in accordance with the rule set up by the “Declaration of Helsinki” guidelines and children’s assent was obtained, when appropriate.

Molecular Analysis

Genomic DNA was extracted using a commercial kit (QIA amp, DNA Blood Mini Kit; Qiagen, Hilden, Germany). Two fragments of *HBB* were used to identify $S\beta$ -thal mutations. For each DNA sample, the fragment 1 (771 bp) was first sequenced and if the mutation was not found, the fragment 2 (572 bp) was then sequenced (Figure 1).

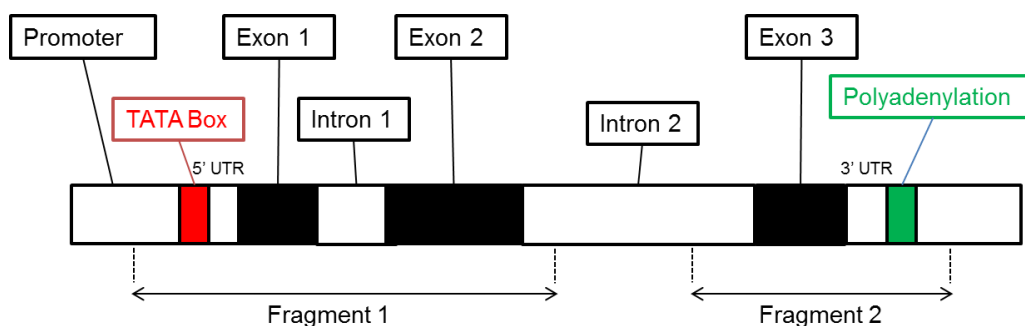


Figure 1 – The β -globin gene representation, showing the sequenced fragments for identification of the β -thal mutations.

Amplification of fragment 1 was obtained from position -161 5' to the CAP site to position 119 in the IVS-II. Fragment 1 was amplified under the following conditions: 250 ng genomic DNA, 10 pmoles of each primer (Forward: 5'-TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG -3'; reverse: 5'-TTTCTTGCCATGAGCCTTC -3');

annealing temperature: 62°C), 200 μM of each dNTP, 2 mM MgCl₂, 5 U Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 1X reaction buffer, in a final volume of 50 μl.

Amplification of fragment 2 was obtained from position 600 in the IVS-II to position 79, 3' to the polyadenylation signal. Fragment 2 was amplified under the following conditions: 250 ng genomic DNA, 10 pmoles of each primer (Forward: 5'-TCATGCCTCTTTGCACCATTC -3'; reverse: 5'-GGGAATGTGGGAGGTCAGTG -3'; annealing temperature: 58°C), 200 μM of each dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 5 U Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1X reaction buffer, in a final volume of 50 μl. The PCR reactions were performed in a thermocycler (Veriti™ Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Sequencing reactions were performed using the BigDye Terminator v3.1 mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the instructions in the kit. Sequence data were generated with an ABI 3130xl capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using standard protocols and analyzed by CodonCode Aligner version 5.0 (CodonCode Corporation, Centerville, MA, USA).

Detection of *HBA* more frequent deletions ($-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$, $--_{SEA}$, $--_{FIL}$, $--_{MED}$, $-(\alpha)^{20.5}$, and $--_{THAI}$) was carried out by multiplex gap PCR as previously described (17); the primers' annealing temperature was increased to 62°C.

Results

Fifty-nine consecutive children with SCD were included (mean age, 10.3 ± 2.9 years); 29 (49.2%) were males. Thirty (50.8%) had Sβ⁰-thal genotype, 24 (40.7%) had Sβ⁺-thal and five (8.5%) were proven to be homozygous SS after their newborn IEF or high-performance liquid chromatography (HPLC) test being read as FSA (see Discussion). Analysis of *HBA* deletions showed that 44 (81.5%) Sβ-thal children were αα/αα, nine (16.7%) $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ and one (1.9%) $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$.

The results of the identification of β-thal mutation are shown in Table 1. Among 30 children with Sβ⁰-thal, 14 (46.7%) children had the nonsense codon 39 (C>T) mutation (HBB: c.118C>T), 12 (40%) had IVS-I-1 (G>A) mutation (HBB:

c.92+1G>A), three (10%) had IVS-II-1 (G>A) mutation (HBB:c.315+1G>A), and one child (3.3%) had IVS-I-2 (T>C) mutation (HBB:c.92+2T>C).

Out of 23 children with S β ⁺-thal, eight (33.3%) had IVS-I-6 (T>C) mutation (HBB: c.92+6T>C), five (20.8%) had -29 (A>G TATA box) mutation (HBB:c.-79A>G), three (12.5%) had IVS-I-110 (G>A) mutation (HBB: c.93-21G>A), two (8.3%) had -92 (C>T) mutation (HBB:c.-142C>T), two (8.3%) had IVS-II-844 (C>A) and IVS-II-839 (T>C) in *cis* mutations (HBB:c.316-7C>A and HBB:c.316-12T>C), two children (8.3%) had IVS-I-5 (G>A) mutation (HBB:c.92+5G>A), one child (4.2%) had -88 (C>T) mutation (HBB:c.-138C>T), and one child (4.2%) had poly A signal (AATAAA>AACAAA) mutation (HBB:c.*110T>C). According to S β ⁺-thal phenotypic classification previously proposed, based on the amount of Hb A produced [type I, 1 to 7% Hb A; type II, 7 to 14% Hb A; type III, 14 to 25% Hb A (3)], five (20.8%) were type I, 15 (62.5%) were type III, and four (16.7%) were type IV (25 to 45% Hb A) (18).

Out of 54 S β -thal children, nine (16.7%) were heterozygous for the C>T polymorphism at codon 2 of the *HBB* (His/His; rs7480526). Five (55.6%) of children carrying the C>T polymorphism at codon 2 had the IVS-I-6 (T>C) mutation.

Table 1 – Spectrum, frequency and distribution of β -thal mutations in Brazil

Mutation	City or State											Total
	Ribeirão Preto ⁶	Campinas ^{7,8}	São Paulo ⁹	Pernambuco ¹⁰	Pernambuco ¹¹	Rio Grande do Sul ¹²	São Paulo ¹³	Different States ¹⁴	Rio Grande do Norte ¹⁵	Bahia ¹⁶	Minas Gerais*	
β^0-thal												
IVS-I-1 G>A		4 (5.7%)		13 (15.1%)	10 (6.1%)	15 (12.9%)	4 (10%)		15 (38.5%)		12 (22.2%)	73 (10.3%)
IVS-I-1 G>T			3 (4.3%)									3 (0.4%)
IVS-I-2 T>C					1 (0.6%)						1 (1.9%)	2 (0.3%)
IVS-II-1 G>A							1 (2,5%)				3 (5.6%)	4 (0.6%)
IVS-II-850 -G						1 (0.9%)						1 (0.1%)
CD6 GAG>TAG							1 (2,5%)					1 (0.1%)
CD6 -A								3 (42.8%)				3 (0.4%)
CD12 -C					1 (0.6%)							1 (0.1%)
CD15 TGG>TGA						3 (2.5%)	1 (2,5%)					4 (0.6%)
CD30 AGG>CGG					1 (0.6%)							1 (0.1%)
CD30 AGG>AGC				1 (1.1%)								1 (0.1%)
CD30 AGG>ACG						1 (0.9%)						1 (0.1%)
CD39 CAG>TAG	27 (47%)	45 (64.3%)	38 (54.3%)	3 (3.5%)	13 (7.9%)	59 (50.9%)	20 (50%)	1 (14.3%)			14 (25.9%)	220 (31.2%)
CD 44 -C							1 (2,5%)			1 (100%)		2 (0.3%)
CD106/107 +G					1 (0.6%)							1 (0.1%)
β^+-thal												
-92 C>T											2 (3.7%)	2 (0.3%)
-88 C>T					4 (2.4%)						1 (1.9%)	5 (0.7%)
-87 C>G								1 (14.3%)				1 (0.1%)
-29 A>G (TATA box)					1 (0.6%)	1 (0.9%)					5 (9.3%)	7 (1%)
IVS-I-5 G>C				8 (9.3%)	25 (15.2%)		3 (7,5%)		1 (2.6%)			37 (5.3%)
IVS-I-5 G>A					4 (2.4%)	2 (1,7%)					2 (3.7%)	8 (1.1%)
IVS-I-6 T>C	9 (15%)	5 (7.1%)	13 (18,6%)	54 (62.8%)	90 (54.9%)	11 (9.5%)	1 (2,5%)	1 (14.3%)	21 (53.8%)		8 (14.8%)	213 (30.3%)
IVS-I-110 G>A	15 (27%)	14 (20%)	13 (18,6%)	7 (8.2%)	5 (3%)	21 (18.1%)	6 (15%)		2 (5.1%)		3 (5.6%)	86 (12.2%)
IVS-I-130 G>A							1 (2,5%)					1 (0.1%)

IVS-II-654 C>T								1 (14.3%)				1 (0.1%)
IVS-II-837 T>G					1 (0.6%)							1 (0.1%)
IVS-II-844 C>A and IVS-II-839 T>C in <i>cis</i>											2 (3.7%)	2 (0.3%)
IVS-II-849 A>G					5 (3%)							5 (0.7%)
CAP +20 C>T						2 (1.7%)	1 (2.5%)					3 (0.4%)
Poly A signal T>C					2 (1.2%)						1 (1.9%)	3 (0.4%)
Not identified	6 (11%)	2 (2.9%)	3 (4.2%)									11 (1.6%)
Total	57 (100%)	70 (100%)	70 (100%)	86 (100%)	164 (100%)	116 (100%)	40 (100%)	7 (100%)	39 (100%)	1 (100%)	54 (100%)	704 (100%)

(6); (7); (8); (9); (10); (11); (12); (13); (14); (15); (16); * present study.

Discussion

In this study, we have characterized the β -thal mutations in a group of children with S β -thal from the state of Minas Gerais, Brazil. About 300 mutations have been so far reported worldwide, 31 of which have also been reported in Brazil (6-13, 15, 16). Overall, 13 different mutations were identified on 54 alleles in this study. Out of these, ten mutations have been previously reported in other Brazilian regions (6-16).

The most frequent mutations in the present study were codon 39 (C>T) (25.9%), followed by IVS-I-1 G>A (22.2%) and IVS-I-6 T>C (14.8%). These three mutations represented 62.9% of mutations reported in the study, showing the broad spectrum of mutations found in the state of Minas Gerais.

Codon 39 (C>T) mutation is probably the most common β -thal mutation reported in Brazil (Table 1), and its frequency is higher in the southeastern (6-9, 13) and southern regions of the country(12), but lower or absent in the Northeast (10, 11, 15). This is a common mutation among Italian (19, 20), Spanish (21, 22), German (23) and Portuguese (24) populations. Probably the immigrants from all of these countries have contributed to introduce this allele in a high frequency into Brazil during and after the colonization period.

The IVS-I-1 G>A mutation has been reported in almost all studies conducted in Brazil, and the highest frequency was observed in our study and that done in the state of Rio Grande do Norte (15). The IVS-I-1 G>A mutation is one of the most common mutations among Portuguese (24) as well as Spanish (21, 25). This supports the hypothesis of a strong genetic contribution of Portuguese people to the epidemiology of β -thal in Brazil.

The so-called Portuguese type (IVS-II-6 T>C) was the third most frequent mutation in this study. It is the second most frequent β -thal mutation reported in Brazil and it was found in almost all studies performed in the country, once more reflecting the Portuguese colonization of the country. Unlike the mutation CD39, it is more frequent in the Northeast (10, 11, 15) than in the Southeast (6-9, 13) and South (12) of Brazil.

The so-called African mutation -29 A>G was reported in five S β ⁺-thal children of our study. This unusually high percentage may be explained by the fact that our study was the only one which dealt strictly with S β -thal patients. The majority of the studies done in Brazil have encompassed patients with β -thalassemia. The -29 A>G variant is the commonest mutation found among the African American people (26, 27). It was

probably introduced into Brazil during the slave trade, between centuries XVI and XIX. IVS-I-2 T>C, -88 C>T and Poly A signal T>C mutations identified in our study may be explained by the same reasons. Our study was the first performed in Brazil to identify these four African mutations co-inherited with the β^S gene. Serjeant et al evaluated a cohort of 261 patients with S β -thal from Jamaica and also reported these mutations (3).

IVS-I-110 (G>A) mutation frequency is in agreement with other studies across the country which showed this mutation in a relatively low rate, but present in almost all studies performed in Brazil (6-13, 15, 16). The low frequency found in Brazil is in agreement with the low frequency found in the Portuguese population (24). It is rather a common mutation found in the Mediterranean region (28), including Italy (20). In Brazil, this mutation is more common in the state of São Paulo and in the South of the country, regions that received the largest contingent of Italian immigrants. IVS-I-110 (G>A) mutation causes a severe phenotype of S β^+ -thal [S β^+ -thal type I, according to classification previously proposed (3)], and affected children may be misclassified as having SS or S β^0 -thal by Newborn Screening Programs using only protein-based screening methods due to the very low synthetic rate of Hb A. In our experience, out of three patients carrying IVS-I-110 (G>A) mutation, one (33.3%) had neonatal FSA electrophoretic profile and two (66.6%) had FS.

In our study, IVS-II-1 G>A mutation was identified for the second time in Brazil. Although this mutation originated from Mediterranean population, it may be found in African Americans (5) and Japanese (29). The immigration of Japanese people to Brazil has started relatively recently (1908) and the majority of them went to the state of São Paulo. Despite the extensive admixture observed in sickle cell patients from the state of Minas Gerais (30), it is very unlikely that this mutation derived from Japanese. The IVS-II-1 G>A mutation was reported in 10% of S β^0 -thal patients in Jamaica (3).

In Brazil, the -92 C>T and IVS-II-844 C>A/IVS-II-839 T>C β -thal mutations were found only in the state of Minas Gerais (31). The -92 C>T mutation has been reported in Sicilia (32) and Italy (33), and was probably introduced in Brazil by Italian immigrants. The IVS-II-844 C>A/IVS-II-839 T>C β -thal mutations were first reported in four unrelated Canadian families of African ancestry. All probands were S β^+ -thal genotype (34). Both -92 C>T and IVS-II-844 C>A / IVS-II-839 T>C mutations cause a very mild form of S β^+ -thal (31, 32, 34). In our experience, the baseline level of Hb A associated with these mutations is about 40% (18).

The majority of β^+ -thal mutations reported in the present study causes a mild form of $S\beta^+$ -thal (20.8% type I *versus* 79.2% Type III or IV). Since the association between β -thal mutations and the clinical phenotype of $S\beta$ -thal is not completely understood, studies should be conducted to allow a more precise prediction of clinical features and prognosis of these patients.

Coinheritance of alpha-thalassemia -3.7 deletion was lower in $S\beta$ -thal (18.6% for the present study) than in previous study done with Hb SS children (27.2% (35)). Since the co-inheritance of a single *HBA* gene deletion has a very small impact on the phenotype of beta-thalassemic patients (36), this finding suggests that the frequency of co-inheritance of alpha-thalassemia with a β -thal allele *in cis* is probably lower than that with the β^S allele.

Five children who were proven to be homozygous SS were misclassified by the Newborn Screening Program. They had a FSA Hb profile according to HPLC and IEF. Misclassification was due to equivocal interpretation of the tests or unsuspected blood transfusion before sampling for the newborn screening. This observation highlights a disadvantage of using only protein-based screening methods and shows the importance of diagnosis based on clinical, laboratory, and genetic information. Based on this and other reasons, since 2010 the NSP-MG follows the strategy of screening first with a protein-based method (IEF) and then a molecular biology method for confirmation (allele-specific PCR for β^S , β^C , β^A , and $\beta^{D-Punjab}$ mutations).

By using a standardized approach, we have been able to identify mutations in 100% of cases in our study. Also it would identify all types of β -thal mutations reported in Brazil (Table 1) and some important minor genetic subtypes of SCD, such as Hb SD-Punjab (*HBB:c.364G>C*) and Korle-Bu (*HBB:c.220G>A*).

It should be emphasized that only $S\beta$ -thal subjects were included in our study and so it possibly does not represent the demographic pattern of β -thal mutations in the state of Minas Gerais.

In summary, the pattern of β -thal mutations differs according to the region in Brazil. Minas Gerais is the second most heterogeneous state in Brazil in terms of β -thal mutations and has a relatively different molecular pattern when compared to other Brazilian regions. The majority of β^+ -thal mutations in Minas Gerais causes a mild form of $S\beta^+$ -thal. A sequencing protocol able to identify all β -thal mutations reported thus far in Brazil was described.

Acknowledgments

The authors acknowledge all subjects and parents for their cooperation in the study. Research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant n°. 304530/2011-5), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMG, grant n°. PPM-00266-13), Fundação Hemominas, and Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (Nupad - UFMG).

References

1. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2010 Dec 11;376(9757):2018-31. PubMed PMID: 21131035.
2. Fernandes AP, Januario JN, Cangussu CB, Macedo DL, Viana MB. Mortality of children with sickle cell disease: a population study. *Jornal de pediatria*. 2010 Jul-Aug;86(4):279-84. PubMed PMID: 20508908.
3. Serjeant GR, Serjeant BE, Fraser RA, Hambleton IR, Higgs DR, Kulozik AE, et al. Hb S-beta-thalassemia: molecular, hematological and clinical comparisons. *Hemoglobin*. 2011;35(1):1-12. PubMed PMID: 21250876.
4. Serjeant GR, Sommereux AM, Stevenson M, Mason K, Serjeant BE. Comparison of sickle cell-beta0 thalassaemia with homozygous sickle cell disease. *Br J Haematol*. 1979 Jan;41(1):83-93. PubMed PMID: 420738.
5. Thein SL. The molecular basis of beta-thalassemia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013 May;3(5):a011700. PubMed PMID: 23637309.
6. Costa FF, tavela MH, Zago MA. Molecular basis of beta-thalassemia in Brazil. *Blood (suppl 1)*. 1990;76(10):58.
7. Martins CS, Ramalho AS, Sonati MF, Goncalves MS, Costa FF. Molecular characterisation of beta thalassaemia heterozygotes in Brazil. *Journal of medical genetics*. 1993 Sep;30(9):797-8. PubMed PMID: 8411081. Pubmed Central PMCID: 1016548.
8. Bertuzzo CS, Sonati MF, Costa FF. Hematological phenotype and the type of beta thalassemia mutation in Brazil. *Braz J Genet*. 1997;20(2):319-21.
9. Fonseca SF, Kerbaui J, Escrivao C, Figueiredo MS, Cancado R, Arruda VR, et al. Genetic analysis of beta-thalassemia major and beta-thalassemia intermedia in Brazil. *Hemoglobin*. 1998 May;22(3):197-207. PubMed PMID: 9629495. Epub 1998/06/18. eng.
10. Araujo AS, Silva I W, Leao SA, Bandeira FC, Petrou M, Modell B, et al. A different molecular pattern of beta-thalassemia mutations in northeast Brazil. *Hemoglobin*. 2003 Nov;27(4):211-7. PubMed PMID: 14649311.
11. Bezerra MA. Aspectos Clínicos, Bioquímicos e Moleculares das Síndromes Talassêmicas em População do Estado de Pernambuco. Campinas: UNICAMP; 2007.
12. Reichert VC, de Castro SM, Wagner SC, de Albuquerque DM, Hutz MH, Leistner-Segal S. Identification of beta thalassemia mutations in South Brazilians. *Ann Hematol*. 2008 May;87(5):381-4. PubMed PMID: 18071703.

13. Viviani NM. Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos associados ao estudo molecular para caracterização da beta-talassemia heterozigótica. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
14. Zamaro PJA, Bonini-Domingos CR. The identification of beta-thalassemia mutants in Brazilians with high Hb F levels. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2010;32:215-8.
15. Silveira ZMLd, Barbosa MdV, Fernandes TAAAdM, Kimura EM, Costa FF, Sonati MdF, et al. Characterization of beta-thalassemia mutations in patients from the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 2011;34:425-8.
16. Fonseca SF, Moura Neto JP, Goncalves MS. Prevalence and molecular characterization of beta-thalassemia in the state of Bahia, Brazil: first identification of mutation HBB: c.135delC in Brazil. *Hemoglobin*. 2013;37(3):285-90. PubMed PMID: 23425035.
17. Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood*. 2001 Jul 1;98(1):250-1. PubMed PMID: 11439976.
18. Belisario AR, Sales RR, Viana MB. Very mild forms of Hb S/beta+-thalassemia in Brazilian children *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015.
19. Murru S, Loudianos G, Deiana M, Camaschella C, Sciarratta GV, Agosti S, et al. Molecular characterization of beta-thalassemia intermedia in patients of Italian descent and identification of three novel beta-thalassemia mutations. *Blood*. 1991 Mar 15;77(6):1342-7. PubMed PMID: 2001456.
20. Rosatelli MC, Tuveri T, Scalas MT, Leoni GB, Sardu R, Faa V, et al. Molecular screening and fetal diagnosis of beta-thalassemia in the Italian population. *Human genetics*. 1992 Aug;89(6):585-9. PubMed PMID: 1511973.
21. Calvo-Villas JM, de la Iglesia Inigo S, Ropero Gradilla P, Zapata Ramos MF, Cuesta Tovar J, Sicilia Guillen F. [Molecular characterization of heterozygous beta-thalassemia in Lanzarote, Spain]. *Medicina clinica*. 2008 Apr 5;130(12):450-2. PubMed PMID: 18405499. Caracterizacion molecular de la betatalasemia en Lanzarote.
22. Amselem S, Nunes V, Vidaud M, Estivill X, Wong C, d'Auriol L, et al. Determination of the spectrum of beta-thalassemia genes in Spain by use of dot-blot analysis of amplified beta-globin DNA. *American journal of human genetics*. 1988 Jul;43(1):95-100. PubMed PMID: 2897787. Pubmed Central PMCID: 1715291.
23. Vetter B, Schwarz C, Kohne E, Kulozik AE. Beta-thalassaemia in the immigrant and non-immigrant German populations. *Br J Haematol*. 1997 May;97(2):266-72. PubMed PMID: 9163586.
24. Faustino P, Pacheco P, Loureiro P, Nogueira PJ, Lavinha J. The geographic pattern of beta-thalassaemia mutations in the Portuguese population. *Br J Haematol*. 1999 Dec;107(4):903-4. PubMed PMID: 10671033.
25. Benito A, Villegas A, Perez-Cano R, Bernal R. Beta-thalassaemia in southwestern Spain: high frequency of G-->A (IVS I-1) mutation. *Br J Haematol*. 1996 Feb;92(2):336-8. PubMed PMID: 8602996.
26. Gonzalez-Redondo JM, Stoming TA, Lanclos KD, Gu YC, Kutlar A, Kutlar F, et al. Clinical and genetic heterogeneity in black patients with homozygous beta-thalassemia from the southeastern United States. *Blood*. 1988 Sep;72(3):1007-14. PubMed PMID: 2458145.
27. Antonarakis SE, Irkin SH, Cheng TC, Scott AF, Sexton JP, Trusko SP, et al. beta-Thalassemia in American Blacks: novel mutations in the "TATA" box and an acceptor splice site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America. 1984 Feb;81(4):1154-8. PubMed PMID: 6583702. Pubmed Central PMCID: 344784.
28. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood reviews*. 2003 Mar;17(1):43-53. PubMed PMID: 12490210.
29. Hattori Y, Yamamoto K, Yamashiro Y, Ohba Y, Miyamura S, Yamamoto K, et al. Three beta-thalassemia mutations in the Japanese: IVS-II-1 (G----A), IVS-II-848 (C---G), and codon 90 (GAG----TAG). *Hemoglobin*. 1992;16(1-2):93-7. PubMed PMID: 1634368.
30. da Silva MC, Zuccherato LW, Lucena FC, Soares-Souza GB, Vieira ZM, Pena SD, et al. Extensive admixture in Brazilian sickle cell patients: implications for the mapping of genetic modifiers. *Blood*. 2011 Oct 20;118(16):4493-5; author reply 5. PubMed PMID: 22021456. Pubmed Central PMCID: 3204916.
31. Belisario AR, Rodrigues RS, Viana MB. Silent forms of Hb S/Beta+-thalassemia type IV in Brazilian children Artigo submetido ao periódico Blood Cells Mol Dis. 2014.
32. Divoky V, Baysal E, Schiliro G, Dibenedetto SP, Huisman TH. A mild type of Hb S-beta(+)-thalassemia [-92(C-->T)] in a Sicilian family. *Am J Hematol*. 1993 Feb;42(2):225-6. PubMed PMID: 8438884.
33. Rosatelli MC, Faa V, Meloni A, Fiorenza F, Galanello R, Gasperini D, et al. A promoter mutation, C-->T at position -92, leading to silent beta-thalassaemia. *Br J Haematol*. 1995 Jun;90(2):483-5. PubMed PMID: 7794779.
34. Waye JS, Eng B, Hellens L, Hohenadel BA, Nakamura LM, Walker L. Mild beta(+)-thalassemia associated with two linked sequence variants: IVS-II-839 (T>C) and IVS-II-844 (C>A). *Hemoglobin*. 2013;37(4):378-86. PubMed PMID: 23651435.
35. Belisario AR, Nogueira FL, Rodrigues RS, Toledo NE, Cattabriga AL, Velloso-Rodrigues C, et al. 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*. 2015 Aug 27;54:44-50. PubMed PMID: 25175566.
36. Thein SL. Genetic modifiers of beta-thalassemia. *Haematologica*. 2005 May;90(5):649-60. PubMed PMID: 15921380.

14. Artigo 8 – Publicado no volume 37 da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (doi:10.1016/j.bjhh.2015.03.010)

Very mild forms of Hb S/beta⁺-thalassemia in Brazilian children

André Rolim Belisário ^{a,b*}, Rahyssa Rodrigues Sales ^b, and Marcos Borato Viana ^a

^a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (HEMOMINAS), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

***Corresponding author at:** Centro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais, Fundação Hemominas, Rua das Goiabeiras, nº 779, Lagoa Santa, 33400-000, Brazil. E-mail: andrebelisario@yahoo.com.br

Abstract

Background: The clinical phenotype of sickle cell/beta⁺-thalassemia (Sβ⁺-thal) is highly variable and molecular predictors of disease severity would be helpful for guiding treatment choices in children with this genotype. **Objective:** The aim of this study was to characterize the hematological parameters, clinical features, and molecular basis of very mild forms of Sβ⁺-thal in a newborn cohort of Minas Gerais state, Brazil. **Methods:** The study included four unrelated children. The genotypes were determined through beta-hemoglobin gene sequencing. **Results:** The mean age was 8.0±2.4 years (range 5.5–11.2 years). Two children had a -92C>T mutation and two had IVS-II-844 C>A plus IVS-II-839 T>C *in cis* mutations. The mean hemoglobin concentration was 12.0±0.7 g/dL and the mean hemoglobin A concentration was 40.4±1.1%. The mean leukocyte count was 8.1±0.5 10⁹/L. All the children were clinically asymptomatic or oligosymptomatic and none of them had complications attributable to sickle cell disease. The -92C>T and IVS-II-844 C>A/IVS-II-839 T>C mutations do not fit the Sβ⁺-thal phenotypic classification previously proposed on the basis of the relative concentration of hemoglobin A: type I, 1–7% of Hb A; type II, 7–14% of Hb A; and type III, 14–25% of Hb A. **Conclusion:** These two mutations associated with the β^S allele lead to a very mild form of Sβ⁺-thal that we have named type IV: 25% to 45% of hemoglobin A.

Key words: Anemia, sickle cell; Beta-thalassemia; Mutation; Prognosis

Introduction

The clinical phenotype of sickle cell/beta⁺-thalassemia (Sβ⁺-Thal) is highly variable, and severity is associated with the quantitative degree of decrease in the production of the beta globin chains (1). Evidence supports that differences in the production of hemoglobin A (Hb A) and severity correspond to different molecular beta-thalassemia (β-Thal) mutations (2). A previous report proposed a classification of S/β⁺-Thal phenotypes based on the relative concentration of Hb A: Type I, 1-7% of Hb A; Type II, 7-14% of Hb A; and Type III, 14-25% of Hb A (2). However, some β-Thal mutations lead to low impairment of β-globin production and the resulting phenotype does not fit this proposed classification. In a single patient report, the -92 (C>T) mutation was associated with a high level of Hb A (45%) in an adult Sicilian patient with S/β⁺-Thal (3). Recently, a combination of two sequence variants, IVS-II-839 (T>C) and IVS-II-844 (C>A), was associated with a very mild phenotype of sickle cell disease (SCD) (4). Because of the marked clinical variability of Hb S/β⁺-Thal patients, molecular predictors of disease severity would be helpful to guide treatment choices in children with this genotype. The objective of this study was to characterize the hematological parameters, clinical features, and molecular basis of very mild forms of S/β⁺-Thal in a newborn cohort of Minas Gerais state, Brazil.

Case series

This is a case series involving children from the Minas Gerais State SCD newborn cohort, Brazil. As part of a yet incomplete study, 56 out of 96 (58.3%) children S/β⁰-thal or S/β⁺-thal from that cohort born between 1998 and 2013 had already been submitted to DNA analysis to identify the β-thal mutations causing Sβ-thal. Children were considered to be eligible for this report if they had Hb A concentration equal or above 25% confirmed by hemoglobin electrophoresis. Children had hemoglobin FSA patterns diagnosed by isoelectric focusing and high-performance liquid chromatography in the Newborn Screening Program and have been followed up since diagnosis in the outpatient care unit of Fundação Hemominas, which is situated in the state capital, Belo Horizonte.

Laboratory and clinical data were retrieved by chart review after approval of the local institutional review board. Hematologic and genetic studies were performed in the parents of two children to elucidate the inheritance pattern of the β -thal mutations.

Complete blood count was performed using an electronic cell counter (model T-890, Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA or Cell-Dyn ruby, Abbott, IL, USA). Hemoglobin electrophoresis was conducted in an alkaline medium (SPIFE kits, Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA). The percentage of Hb F was quantified by radial immunodiffusion (HbF QUIPlate, Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA). Reticulocyte count was measured by optical microscopy with brilliant cresyl blue.

Genomic DNA was isolated with a QIAGEN kit (QIAamp® DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany). The *HBB* gene was amplified with specific primers. Sequence data were generated with an ABI 3130xl capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using standard protocols. A multiplex gap polymerase chain reaction (PCR) assay was used to detect the most common alpha-thalassemia deletions (5).

Written informed consent was obtained from parents or guardian of every child in accordance with the rule set up by the Declaration of Helsinki guidelines and children's assent was obtained when appropriate.

The study included four unrelated children with diagnosis of Hb S/ β^+ -Thal. The mean age was 8.0 ± 2.4 years (range: 5.5–11.2 years) and all were male. These children were followed for a mean of 7.7 ± 2.4 years (range: 5.2–11 years).

Two children had a -92 (C>T) mutation (HBB:c.-142C>T) and two had IVS-II-844 (C>A) (HBB:c.316-7C>A) plus IVS-II-839 (T>C) (HBB:c.316-12T>C) mutations (Figure 1). Genetic family studies showed that IVS-II-844 (C>A) and IVS-II-839 (T>C) mutations were in *cis* in both children because both mutations were inherited from just one of the parents. No child had co-inherited alpha-thalassemia deletions. The mean relative concentration of Hb A was 40.4% and that of Hb S 54%. Genetic, laboratory, and family data are summarized in Table 1.

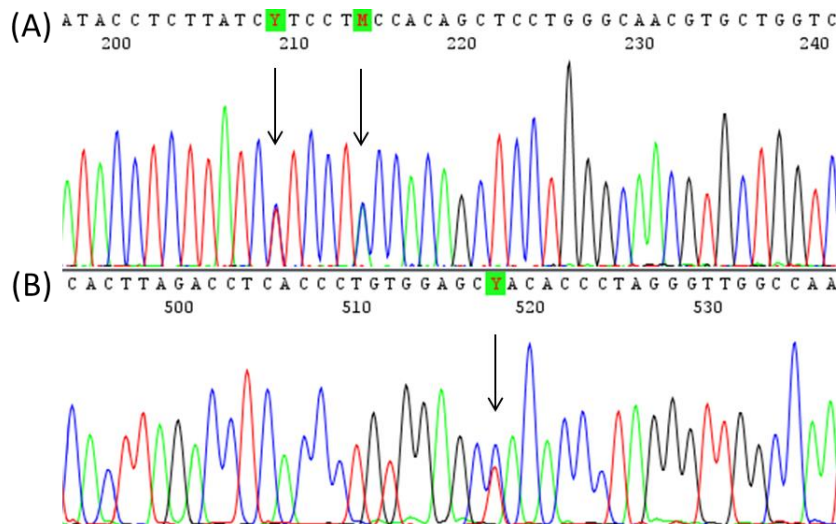


Figure 1 – Sequencing four-color chromatogram showing (A) IVS-II-844 (C>A) and IVS-II-839 (T>C) mutations in *cis*; and (B) the -92 (C>T) mutation.

All children were clinically oligosymptomatic and led normal lives. Except for an obstruction of the airways caused by adenoid glands, child number I was asymptomatic during the follow-up period. Child number II suffered from two infectious episodes: virus infection, for which a five-day hospitalization was required, and impetigo, treated with benzathine penicillin. He has had recurrent headaches, but neurologic physical examination was normal. Except for a sinusitis episode, child number III was asymptomatic during the follow-up period. Child number IV suffered from recurrent headaches, but neurologic physical examination was normal. None of the children have had severe acute clinical manifestations of SCD such as acute painful crises, stroke, acute chest syndrome, or acute splenic sequestration.

Table 1- Genetic, laboratory, and family characteristics of children with very mild forms of Hb S/ β^+ -thal in Minas Gerais, Brazil

Data	Family I			Family II			Family III	Family IV
	Child I	Mother	Father	Child II	Mother	Father	Child III	Child IV
Beta-globin genotype	$\beta^S/\beta^{\text{Thal IVSII-844/839}}$	$\beta^A/\beta^{\text{Thal IVSII-844/839}}$	NA	$\beta^S/\beta^{\text{Thal IVSII-844/839}}$	β^S/β^A	$\beta^A/\beta^{\text{Thal IVSII-844/839}}$	$\beta^S/\beta^{\text{Thal -92 C>T}}$	$\beta^S/\beta^{\text{Thal -92 C>T}}$
Age (years)	7.4			8.0			5.5	11.2
Gender	Male	Female	Male	Male	Female	Male	Male	Male
Hemoglobin (g/dL)	12.9±0.4	11.2	16.1	12.0±0.8	14.5	16.8	11.4±1.1	11.5±0.6
Hematocrit (%)	40±1.1	35.1	47.1	37.5±2.5	43	50.2	35.4±2.1	35.3±1.4
Red blood cells ($10^6/\mu\text{L}$)	5.5±0.3	4.1	5.52	5.3±0.3	4.5	5.8	4.7±1.1	4.6±0.2
Mean corpuscular volume (fL)	74.5±3.4	85.7	85.3	75.0±1.1	95.5	86.2	78±0.8	78.4±2.5
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	24±0.7	27.2	29.1	23.5±0.4	33.7	33.5	25.7	25.2±1.2
Reticulocyte count (%)	1.2±0.7	2.1	0.7	1.1±0.4	1	0.9	0.9±0.7	0.9±0.6
Leukocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	11.3±2.6	8.2	7.8	5.5±0.7	8.5	3.5	9.6±2.5	5.8±1.0
Platelets ($10^3/\mu\text{L}$)	387.7±50	239.5	233	273.8±26.5	180	169	255.5±14.8	312.1±63.6
Hemoglobin A (%)	38.3±1.3	97	51	41.0±2.2	52	95.5	41	41.4±0.9
Hemoglobin S (%)	55.2±2.1	0	45	54.2±1.8	44	0	54	53.6±0.5
Hemoglobin F (%)	3.5±1.0	1	2	2.0±0.7	2	1.5	2	1.8±0.4
Hemoglobin A2 (%)	3.0±0	2	2	2.8±0.4	2	3	3	3.2±0.8
Alpha-globin genotype	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	NA	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$

Means and standard deviations refer to several values for each patient during their clinical follow-up at Hemominas Blood Center; NA: DNA not available.

Discussion

Our study described a group of Hb S/ β^+ -thal patients with normal or nearly normal hematological data and the absence of complications attributable to SCD. To the best of our knowledge, this is the first study to report the occurrence of -92 (C>T), and IVS-II-844 (C>A) / IVS-II-839 (T>C) β -thal mutations in Brazil.

The degree of β -chain synthesis in Hb S/ β^+ -thal patients depends primarily on the β -Thal molecular mutation. The IVS-II-844 (C>A)/IVS-II-839 (T>C) mutation affects the consensus splice site and interferes with processing of the primary mRNA transcript. It modifies the conserved polypyrimidine tract of the splice acceptor site causing reduction of beta globin chain expression to around 60% of normal (4, 6). Carriers of this mutations described in this report showed a mean Hb A value of 39.7 % and were oligosymptomatic. This finding is consistent with the first report of these two variants in four unrelated Canadian families of African ancestry. Probands were asymptomatic Hb S β^+ -thal patients and the adults had Hb A levels of about 44% (4). This is the second study worldwide to report these two linked sequence variants in *cis*. The IVS-II-844 mutation has also been identified in beta-thalassemia patients without the concomitant IVS-II-839 mutation being reported (7-9).

The -92 (C>T) is a transcriptional mutation affecting the β -globin gene promoter (6). This study showed that this mutation leads to a nearly asymptomatic phenotype of SCD with a mean Hb A value of 41.4%. This finding is in agreement with those of other investigators (3). This mutation was first reported in association with the β^S allele in a Sicilian adult with a high level of Hb A (45%) who was clinically asymptomatic (3). This is the second study to report the -92 (C>T) mutation in Hb S β^+ -thal patients. Heterozygous beta-thalassemia patients affected by this mutation also showed a silent form of disease, whereas compound heterozygotes with codon 39 or IVS-II-745 mutations developed beta-thalassemia intermedia (10).

According to our findings and those of other investigators (3, 4), both -92 (C>T) and IVS-II-844 (C>A)/IVS-II-839 (T>C) mutations cause a very mild form of S β^+ -thal. These mutations do not fit into the Hb S β^+ -thal phenotypic classification as proposed by Serjeant *et al.* based on the amount of Hb A produced (2). This phenotypic classification was based on data from Jamaican patients with sickle cell disease and so it does not represent all Hb S/ β^+ -thal patients worldwide. As the original classification is

limited to patients with 1 to 25% of Hb A, we accordingly propose here a fourth Hb S/ β^+ -thal phenotype, with an amount of Hb A ranging from 25 to 45%. Molecular diagnosis of these types of Hb S/ β^+ -thal by newborn screening programs confers a “good” prognosis and will surely reduce anxiety and stress in family caregivers of children recently diagnosed with this subtype of SCD.

A few limitations of our study warrant mention. Given that the studied cases were children, possible long-term complications cannot be predicted. Owing to the small number of patients, the present report may not fully represent these rare Hb S/ β^+ -thal genotypes.

In summary, -92 (C>T) and IVS-II-844 (C>A)/IVS-II-839 (T>C) mutations associated with the β^S allele lead to a very mild form of Hb S/ β^+ -thal, which we have named type IV (25%-45% of Hb A). Research is needed to determine whether other modifying genetic or environmental factors may aggravate the phenotype of affected patients.

Declaration of Interest

The authors report no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors acknowledge all subjects and parents for their cooperation in the study. The research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant n°. 304530/2011-5), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMG, grant n°. PPM-00266-13), Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (Hemominas), and Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (Nupad - UFMG).

References

1. Serjeant GR. The natural history of sickle cell disease. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 2013;3:a011783.

2. Serjeant GR, Serjeant BE, Fraser RA, Hambleton IR, Higgs DR, Kulozik AE, Donaldson A. Hb S-beta-thalassemia: molecular, hematological and clinical comparisons. *Hemoglobin* 2011;35:1-12.
3. Divoky V, Baysal E, Schiliro G, Dibenedetto SP, Huisman TH. A mild type of Hb S-beta(+)-thalassemia [-92(C->T)] in a Sicilian family. *Am J Hematol* 1993;42:225-226.
4. Waye JS, Eng B, Hellens L, Hohenadel BA, Nakamura LM, Walker L. Mild beta(+)-thalassemia associated with two linked sequence variants: IVS-II-839 (T>C) and IVS-II-844 (C>A). *Hemoglobin* 2013;37:378-386.
5. Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood* 2001;98:250-251.
6. Thein SL. The molecular basis of beta-thalassemia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2013;3:a011700.
7. Bianco I, Lerone M, Foglietta E, Deidda G, Cappabianca MP, Morlupi L, Ponzini D, Grisanti P, Di Biagio P, Amato A, Mezzabotta M, Graziani B. Phenotypes of individuals with a beta thal classical allele associated either with a beta thal silent allele or with alpha globin gene triplication. *Haematologica* 1997;82:513-525.
8. Murru S, Loudianos G, Deiana M, Camaschella C, Sciarratta GV, Agosti S, Parodi MI, Cerruti P, Cao A, Pirastu M. Molecular characterization of beta-thalassemia intermedia in patients of Italian descent and identification of three novel beta-thalassemia mutations. *Blood* 1991;77:1342-1347.
9. Rosatelli MC, Pischedda A, Meloni A, Saba L, Pomo A, Travi M, Fattore S, Cao A. Homozygous beta-thalassaemia resulting in the beta-thalassaemia carrier state phenotype. *Br J Haematol* 1994;88:562-565.
10. Rosatelli MC, Faa V, Meloni A, Fiorenza F, Galanello R, Gasperini D, Amendola G, Cao A. A promoter mutation, C->T at position -92, leading to silent beta-thalassaemia. *Br J Haematol* 1995;90:483-485.

15. Conclusões

Artigo 1

- Não houve associação entre o polimorfismo *VCAM* c.1238G>C e AVC ou DCV.
- Houve associação entre o alelo *TNFA* -308A e maior risco ocorrência de AVC.
- Houve associação entre a coexistência de talassemia alfa e menor risco ocorrência de AVC e DCV.

Artigo 2

- Usando uma análise longitudinal, o genótipo homozigoto Q da variante *ENPPI* K173Q foi associada com um aumento de risco de AVC e, possivelmente, com desenvolvimento de DTC de alto risco.

Artigo 3

- O modelo multivariado final de risco de AVC incluiu contagem de leucócitos, contagem de reticulócitos, taxa de síndrome torácica aguda e os polimorfismos *TEK* rs489347 e *TNF- α* rs1800629.
- O modelo para DTC de alto risco incluiu contagem de reticulócitos e os polimorfismos *TEK* rs489347 e *TGFBR3* rs284875.

Artigo 4

- A deficiência de G6PD, definida molecularmente, não influenciou o risco de AVC ou DTC de alto risco, bem como características hematológicas, nas crianças estudadas.
- Não houve associação entre a atividade de G6PD e a ocorrência de AVC ou DTC de alto risco.
- Houve correlação positiva significativa entre a atividade de G6PD e a contagem de reticulócitos no sangue periférico.

Artigo 5

- Crianças com Hb S/HPFH possuem apresentação clínica leve, embora manifestações clínicas agudas possam ocorrer.
- Crianças com Hb S/HPFH possuem baixo risco de desenvolvimento de AVC isquêmico detectado pelo DTC.

Artigo 6

- Não houve associação entre polimorfismos na região promotora de *IL10*, bem com dos haplótipos formados por eles, e o risco ocorrência de AVC ou DTC de alto risco.

Artigo 7

- Minas Gerais é o segundo estado brasileiro mais heterogêneo em termos de mutações causadoras de talassemia beta e tem um padrão relativamente diferente quando comparado com outras regiões brasileiras.

Artigo 8

- As mutações -92 (C>T) e IVS-II-844 (C>A)/IVS-II-839 (T>C) associadas ao alelo β^S causam uma forma muito leve de $S\beta^+$ -talassemia.

16. Anexos

Anexo 1 – Protocolo de determinação do alelo β^S

A amplificação do fragmento do *HBB* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 μ L contendo tampão para PCR 1X, 3 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP (Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados), 2 pmoles de cada oligonucleotídeo (direto: 5'-TGATGGTATGGGGCCAAGA-3'; reverso: 5'-GGGTGGGAAAATAGACCAATA-3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A reação de amplificação foi feita em termociclador (Veriti, Applied Biosystems, T100 Thermal Cycler, Bio-Rad ou Mastercycler gradiente, Eppendorf) com uma fase inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (488 pares de base - pb) foi digerido com enzima de restrição (FastDigest® DdeI, Thermo Scientific) à temperatura de 37°C durante 15 minutos, numa reação de volume final de 20 μ L (10 μ L do produto da amplificação, 2 μ L de tampão FastDigest® 1X, 0,5 μ L da enzima DdeI [5U] e 7,5 μ L de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 μ L do produto da RFLP adicionado de 1 μ L do tampão de corrida xileno cianol 5X (Tris 50mm pH 7,6; EDTA 5M; SDS 5%; xileno cianol 0,1%; sacarose 28%) foram aplicados em gel de agarose 3% (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contendo brometo de etídio (10 μ g/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba (LCH – 13 x 15, Loccus Biotecnologia) contendo tampão TAE 1X (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético; 1 mM EDTA - pH 8,0). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos (Gel Doc™, XR+ com image Lab™ software, BIO-RAD). Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 100 pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

A enzima DdeI reconhece e cliva no sítio de restrição 5'...C↓TNAG...3'. Dessa forma, o fragmento portador do alelo selvagem foi clivado nas posições 27, 40, 62, 107 e 287 da sequência amplificada; o fragmento do alelo mutante (β^S) não possui o sítio na posição 287 devido à substituição A290T. O genótipo homocigoto para o alelo β^S foi definido pelos fragmentos de 13 pb, 22 pb, 27 pb, 45 pb e 381 pb. O genótipo heterocigoto foi determinado pelos fragmentos de 13 pb, 22 pb, 27 pb, 45 pb, 180 pb, 201 pb e 381 pb, sugerindo o genótipo S β -tal. Com a utilização desta técnica, o genótipo homocigoto para o alelo β^A seria determinado pela presença no gel dos fragmentos de 13 pb, 22 pb, 27 pb, 45 pb, 180 pb e 201 pb. A figura 11 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

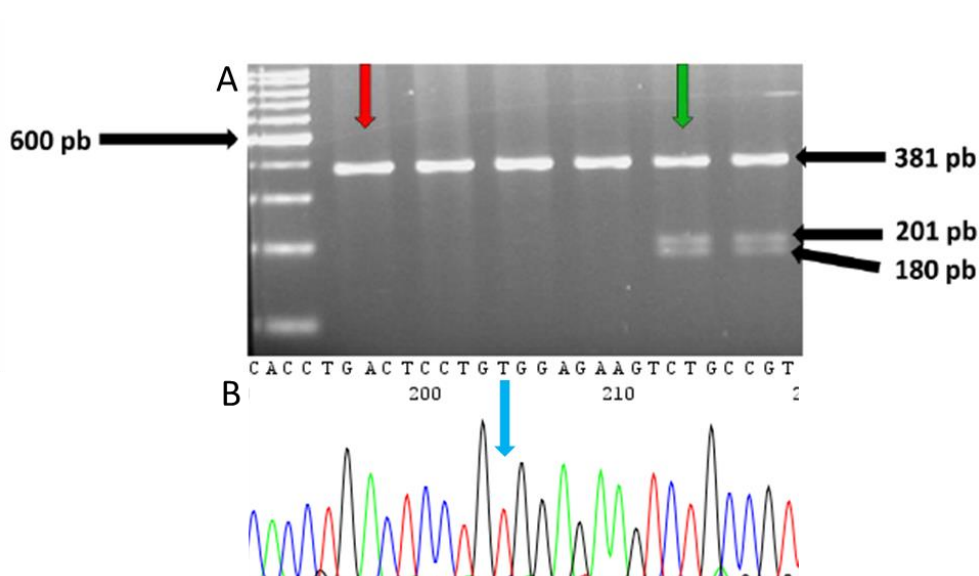


Figura 11 – Genotipagem do alelo β^S (*HBB*:c.20A>T, p.E6V). (A) Gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do fragmento do gene da beta globina. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pares de base. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo Hb SS. A seta verde indica a amostra de um indivíduo heterocigoto para o sítio de restrição, sugerindo o genótipo S β -tal. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores, mostrando o alelo β^S em homocigose (seta azul).

Anexo 2 – Protocolo de diagnóstico molecular de talassemia alfa

Para as reações de gap-PCR múltipla foram desenhados oligonucleotídeos sintéticos específicos para cada uma das sete principais deleções dos genes de globina α

(HBA) causadoras de α -Tal. A identidade de cada deleção foi obtida pela determinação do tamanho do fragmento amplificado em cada reação. Visto que qualquer uma das sete deleções remove parte ou todo o gene $\alpha 2$ globina, sua amplificação, juntamente com a amplificação de um alelo de deleção, indicava que a mutação encontrava-se em heterozigose. Como controle positivo para o sucesso da amplificação do DNA, foi utilizado um segmento de 2.350 pb, referente à região 3' não transcrita do gene LIS 1 (fator plaquetário), localizado no cromossomo 17p13.3.

A Figura 12 representa esquematicamente o agrupamento de genes da α -globina, indicando-se a extensão representativa de cada deleção e a posição relativa de cada oligonucleotídeo.

A reação da PCR múltipla foi padronizada para permitir a detecção das sete deleções em uma reação de tubo único. A especificidade da técnica de PCR múltipla para o diagnóstico das deleções mais comuns causadoras de α -Tal foi confirmada utilizando-se controles positivos para as sete deleções testadas, cedidos gentilmente pelo Dr. Samuel S. Chong (Universidade de Cingapura).

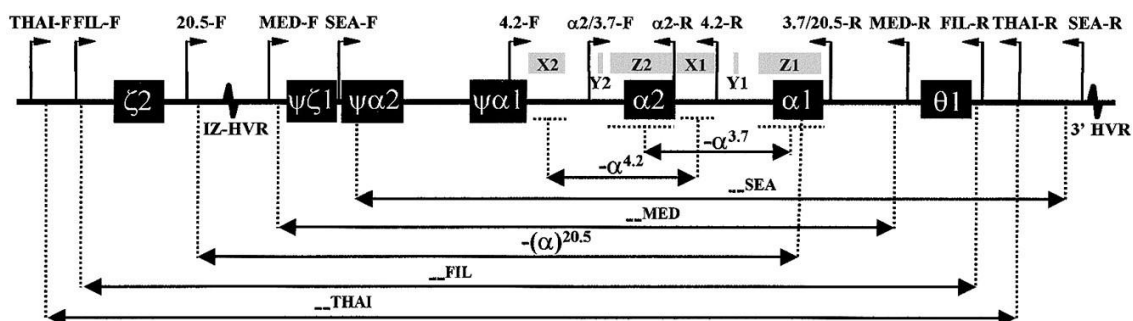


Figura 12 - Ilustração do agrupamento de genes da globina alfa, extensão das deleções e posição dos oligonucleotídeos .

Fonte: Tan et al., 2001

As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit comercial para PCR múltipla (QIAGEN® Multiplex PCR kit, QIAGEN). Os ensaios para diagnóstico molecular de α -Tal foram realizados nas seguintes condições: volume final de 15 μ L contendo 100 μ M de cada dNTP, 0,75 μ M $MgCl_2$ e 1,25 U HotStarTaq DNA

polimerase (*Qiagen master mix*), oligonucleotídeos sintéticos em concentrações distintas (Tabela 2), 1X solução Q e 250 ng de DNA genômico.

Com relação aos ciclos da PCR, estabeleceu-se: ativação da enzima *hot start* e desnaturação do DNA a 96°C por 15 minutos, seguido de 30 ciclos de 98°C por 45 segundos para desnaturação do DNA, 62°C durante 90 segundos para anelamento dos iniciadores, 72°C por 135 segundos para ação da DNA polimerase, seguido por uma extensão final de 5 minutos a 72°C (Veriti, Applied Biosystems).

Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos sintéticos para cada tipo de deleção da α -Tal, respectivas concentrações utilizadas nas reações de PCR e tamanho esperado dos produtos da amplificação

Gene ou tipo de deleção	Sequência 5`-3`	Concentração	Tamanho do fragmento esperado
LIS1-F	ATACCATGGTTACCCATTGAGC	0.5 μ M	
LIS1-R	AGGGCTCATTACATGTGGACCC	0.5 μ M	2350 pb
α 2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	0.2 μ M	2022/2029 pb
3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	0.2 μ M	
α 2-R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	0.2 μ M	1800 pb
4.2-F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	0.5 μ M	
4.2-R	CCCGTTGGATCTTCTCATTTCCC	0.5 μ M	1628 pb
SEA-F	CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC	0.2 μ M	
SEA-R	AGCCCACGTTGTGTTTCATGGC	0.2 μ M	1349 pb
THAI-F	GACCATTCCCTCAGCGTGGGTG	0.3 μ M	
THAI-R	CAAGTGGGCTGAGCCCTTGAG	0.3 μ M	1153 pb
20.5-F	GCCCAACATCCGGAGTACATG	0.2 μ M	1007 pb
MED-F	TACCCTTTGCAAGCACACGTAC	0.2 μ M	
MED-R	TCAATCTCCGACAGCTCCGAC	0.2 μ M	807 pb
FIL-F	TTTAAATGGGCAAAACAGGCCAGG	1.0 μ M	
FIL-R	ATAACCTTTATCTGCCACATGTAGC	1.0 μ M	546 pb

Fonte: Tan et al., 2001

Para resolução dos produtos da PCR, 15 μ L do produto adicionado de 1 μ L do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (10 μ g/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 90 volts durante 2 horas em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de

fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. A determinação do genótipo foi realizada de acordo com o tamanho dos fragmentos amplificados, quando comparados com o padrão de peso molecular 500 pb (500 bp DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Figura 12).

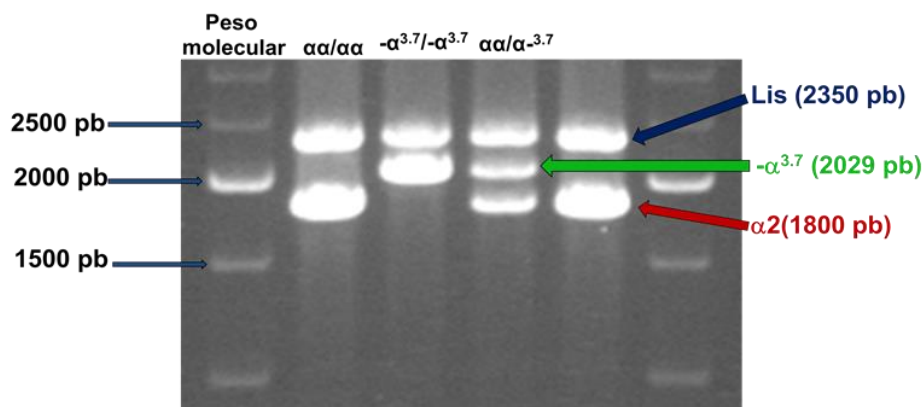


Figura 12 – Fotografia do gel de agarose 1% contendo produtos da PCR múltipla para diagnóstico molecular da talassemia alfa. Nas canaletas 2, 3 e 4 foram aplicadas amostras com os genótipos $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, respectivamente. Nas canaletas 1 e 6 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 500 pares de base. As setas azul, verde e vermelha indicam, respectivamente, as bandas do gene controle *LIS*, deleção $-\alpha^{3.7}$ e do gene $\alpha 2$.

Anexo 3 – Protocolo de determinação do SNP no gene codificador de ADCY9

A amplificação do fragmento do gene *ADCY9* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 μ L contendo tampão para PCR 1X, 2,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo (direto: 5'-AGTTGTCCGGTCCGAGTTGTA-3'; reverso: 5'-TGGCTCTGGCTGTCCTGAT-3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (282 pb) foi digerido com enzima de restrição (*BsmFI*, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 65°C durante toda noite (*overnight*), numa reação de volume final de 20 μ L (10 μ L do produto da

amplificação, 2 µL de tampão NEBuffer 4 1X, 1 µL da enzima BsmFI [2U] e 7 µL de água tipo D).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 µL do produto da RFLP adicionado de 1 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio (10µg/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 100 pb.

A enzima BsmFI reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...GGGAC(N)₁₀↓...'. Dessa forma, o fragmento contendo o alelo selvagem G em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 146 pb, 60 pb, 49 pb, 19 pb e 8 pb; o fragmento contendo o alelo mutante A em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 209 pb, 49 pb, 19 pb e 8 pb. O genótipo heterozigoto é identificado quando da presença de todos os fragmentos. A figura 13 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

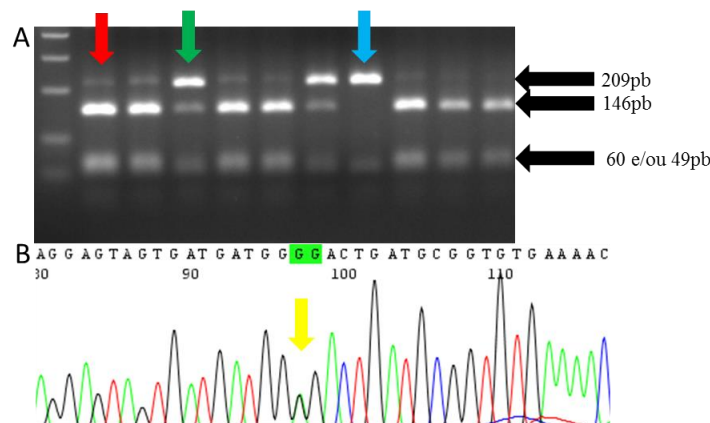


Figura 13 – Genotipagem do polimorfismo *ADCY9* (rs2238432). (A) Gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene de *ADCY9*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pb. A seta verde indica a amostra de indivíduo homozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GG. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo heterozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GA. A seta azul indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição na posição rs2238432, caracterizando o genótipo AA. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *ADCY9*, mostrando os alelos G e A em heterozigose (seta amarela).

Anexo 4 – Protocolo de determinação do SNP no gene codificador de ANXA2

A amplificação do fragmento do gene *ANXA2* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 µL contendo tampão para PCR 1X, 1 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTPs, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'-AATCATGTAGCAGGGCCCG-3'; reverso: 5'-TGGAGTGTAGTGGTGCGATCA-3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 45 segundos, 68°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (707 pb) foi digerido com enzima de restrição (HpyCH4IV, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 37°C *overnight*, numa reação de volume final de 20 µL (10 µL do produto da amplificação, 2 µL de tampão NEBuffer 1 1X, 0,5 µL da enzima HpyCH4IV [5U] e 7,5 µL de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 µL do produto da RFLP adicionado de 1 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio (10µg/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos para presença ou ausência dos sítios de restrição foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 100 pb.

A enzima HpyCH4IV reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...A↓CGT...3'. Dessa forma, o fragmento contendo o alelo selvagem C em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 356 pb e 351 pb; o fragmento de 707 pb contendo o alelo mutante T em homozigose não apresenta sítio de restrição. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 14 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

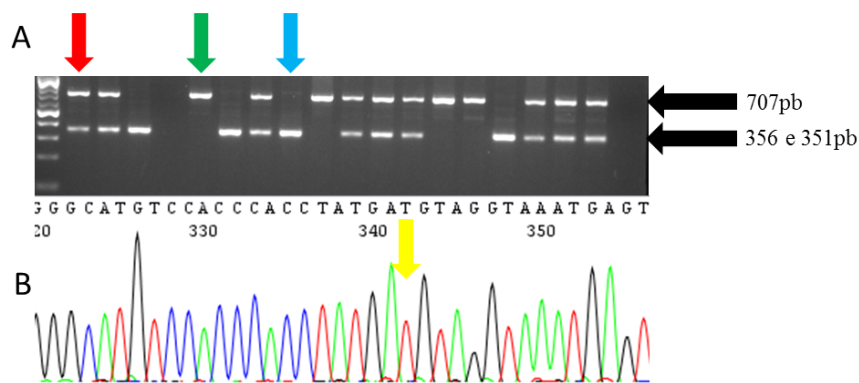


Figura 14 – Genotipagem do polimorfismo *ANXA2* (rs11853426). (A) Gel de agarose 2% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene de *ANXA2*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pb. A seta verde indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo TT. A seta azul indica a amostra de indivíduo homocigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo CC. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo heterocigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo TC. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *ANXA2*, mostrando o alelo A em homocigose (seta amarela).

Anexo 5 – Protocolo de determinação do SNP no gene codificador de ENPP1

A amplificação do fragmento do gene *ENPP1* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 μ L contendo tampão para PCR 1X, 2 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'-AGCAGGGAAAAAGTGGAGT-3'; reverso: 5'-TTATGAAGCTGGGTGATGGGT-3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (1370 pb) foi digerido com enzima de restrição (AvaII, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 37°C *overnight*, numa reação de volume final de 20 μ L (10 μ L do produto da amplificação, 2 μ L de tampão NEBuffer 3 1X, 0,5 μ L da enzima AvaII [5U] e 7,5 μ L de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 μ L do produto da RFLP adicionado de 1 μ L do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio (10 μ g/mL). A corrida de eletroforese foi

realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 250 pb.

A enzima *AvaII* reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...G↓GWCC...3'. Dessa forma, o fragmento contendo o alelo mutante C em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 1109 pb e 261 pb; o fragmento de 1370 pb contendo o alelo selvagem A em homozigose não apresenta sítio de restrição. O indivíduo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 15 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

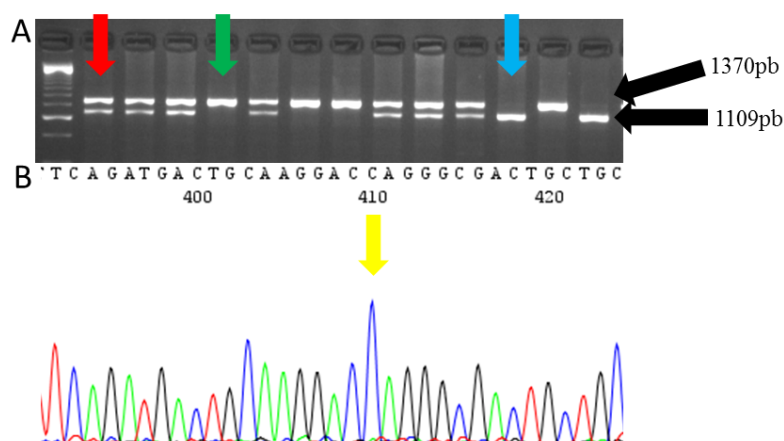


Figura 15 – Genotipagem do polimorfismo *ENPPI* (rs1044498). (A) Gel de agarose 2% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene de *ENPPI*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 250 pb. A seta verde indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo AA. A seta azul indica a amostra de indivíduo homozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo CC. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo heterozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo CA. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *ENPPI*, mostrando o alelo C em homozigose (seta amarela).

Anexo 6 – Protocolo de determinação do SNP no gene codificador de GOLGB1

A amplificação do fragmento do gene *GOLGB1* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 µL contendo tampão para PCR 1X, 2,0 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'-TTTGCTCCAAGCAGAAATCAG-3'; reverso: 5'-AATCTGGGCAACAGAAGTTCC-3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (595 pb) foi digerido com enzima de restrição (HpyCH4III, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 37°C *overnight*, numa reação de volume final de 20 µL (10 µL do produto da amplificação, 2 µL de tampão NEBuffer 4 1X, 1 µL da enzima HpyCH4III [5U] e 7 µL de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 10 µL do produto da RFLP adicionado de 1 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de poliacrilamida 12%. A corrida de eletroforese foi realizada a 90 volts, durante 120 minutos em cuba contendo TBE 1X (0,089M Tris base, 0,089M ácido bórico, 0,002M EDTA). Após o término da eletroforese, o gel foi corado utilizando solução contendo brometo de etídio (0,01µg/mL). Em seguida, o gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 50 pb (50 bp DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

A enzima HpyCH4III reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...ACN↓GT... '3. Dessa forma, o fragmento contendo o alelo selvagem A em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 268 pb, 221 pb e 106 pb; o fragmento contendo o alelo mutante G em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 268 pb, 202 pb, 106 pb e 19 pb. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 16 mostra a fotografia de um gel de poliacrilamida contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

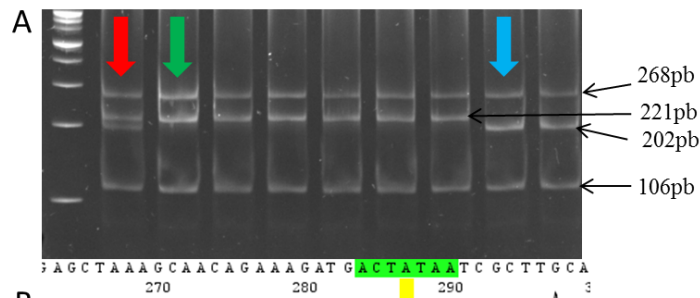


Figura 16 – Genotipagem da variante *GOLGB1* Y1212C (rs3732410). (A) Gel de poliacrilamida 12% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene *GOLGB1*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pb. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo heterozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo AG. A seta verde indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo AA. A seta azul indica a amostra de indivíduo homozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GG. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *GOLGB1*, mostrando os alelos G e A em heterozigose (seta amarela).

Anexo 7 – Protocolo de determinação do SNP no gene codificador de IL-4R

A amplificação do fragmento do gene IL-4R foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 µL contendo tampão para PCR 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'-CTTACCGCAGCTTCAGCGAC-3'; reverso: 5'-CACAGTGGTTGGCTCAGAGA-3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (140 pb) foi digerido com enzima de restrição (FastDigest® HinfI, Thermo Scientific) à temperatura de 37°C durante 15 minutos, numa reação de volume final de 20 µL (10 µL do produto da amplificação, 2 µL de tampão FastDigest® 1X, 0,5 µL da enzima HinfI [5U] e 7,5 µL de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 µL do produto da RFLP adicionado de 1 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio (10µg/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 50 pb (50 bp DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

A enzima *HinfI* reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...G↓ANTC...3'. Dessa forma, o fragmento contendo o alelo selvagem T em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 120 pb e 20 pb; o fragmento de 140 pb do alelo mutante C em homozigose não apresenta sítio de restrição. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 17 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

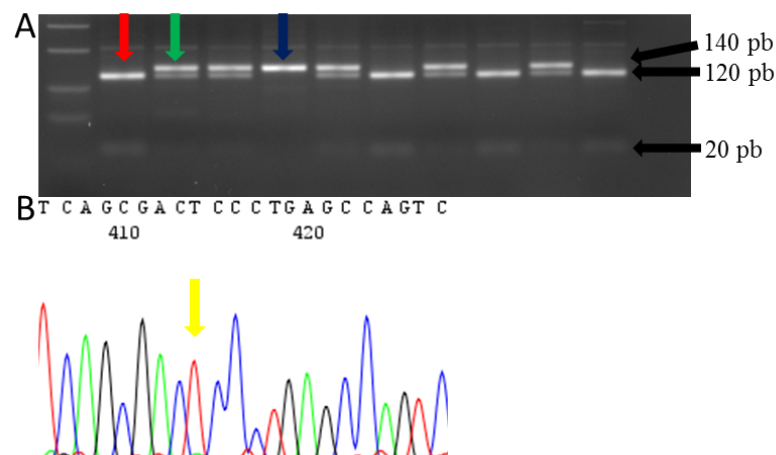


Figura 17 – Genotipagem da variante *IL-4R S503P* (rs1805015). (A) Gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do fragmento do gene *IL-4R*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 50 pares de base. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo homozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo TT. A seta verde indica a amostra de indivíduo heterozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo TC. A seta azul indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo CC. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *IL-4R*, mostrando o alelo T em homozigose (seta amarela).

Anexo 8 – Protocolo de determinação do SNP IL-10 A-1082G

A amplificação do fragmento do gene *IL-10* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 µL contendo tampão para PCR 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'-CCAAGACAACACTACTAAGGCTTCTTGAGGA-3'; reverso: 5'-AGGTAGTGCTCACCATGACC-3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, mais uma fase de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (360 pb) foi digerido com enzima de restrição (BseRI, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 37°C *overnight*, numa reação de volume final de 20 µL (10 µL do produto da amplificação, 2 µL de tampão NEBuffer 4 1X, 0,6 µL da enzima BseRI [6U] e 7,4 µL de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 µL do produto da RFLP adicionado de 1 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio (10µg/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 100 pb.

A enzima BseRI reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...G↓ANTC...'. Dessa forma, o fragmento de 360 pb contendo o alelo selvagem A em homozigose não apresenta sítio de restrição; o fragmento contendo o alelo mutante G quando clivado, gera fragmentos de 320 pb e 40 pb. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 18 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

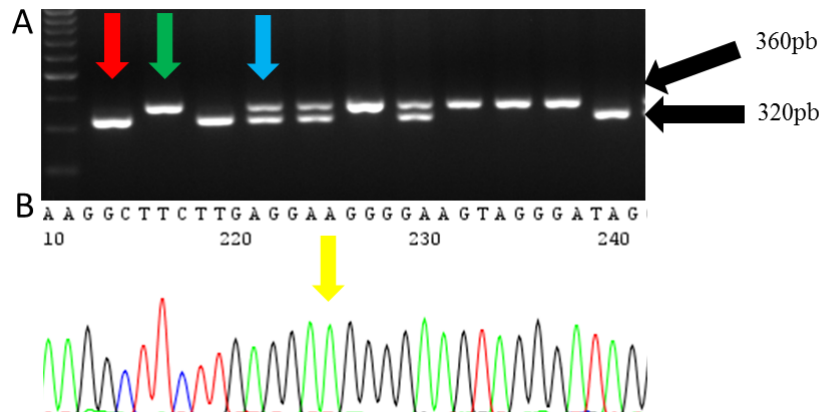


Figura 18 – Genotipagem do SNP *IL-10 G-1082A* (rs1800896). (A) Gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene *IL-10*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pb. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo homocigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GG. A seta verde indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo AA. A seta azul indica a amostra de indivíduo heterocigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo AG. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *IL-10*, mostrando os alelo A em homocigose (seta amarela).

Anexo 9 – Protocolo de determinação do SNP *IL-10 C-819T*

A amplificação do fragmento do gene *IL-10* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 μ L contendo tampão para PCR 1X, 2 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'- ATCCAAGACAACACTACTAA -3'; reverso: 5'- GGCTAAATATCCTCAAAGTT -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, mais uma fase de extensão final de 3 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (591 pb) foi digerido com enzima de restrição (MaeIII, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 37°C *overnight*, numa reação de volume final de 20 μ L (10 μ L do produto da amplificação, 2 μ L de tampão NEBuffer 4 1X, 0,5 μ L da enzima MaeIII [5U] e 7,5 μ L de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 μ L do produto da RFLP adicionado de 1 μ L do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de

agarose 3% contendo brometo de etídio (10µg/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 100 pb.

A enzima MaeIII reconhece e cliva o sítio de restrição 5'... ↓GTNAC... '3. Dessa forma, o fragmento contendo o alelo selvagem C em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 292 pb, 216 pb e 82 pb; o fragmento contendo o alelo mutante T em homozigose gera fragmentos de 508 pb e 82 pb. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 19 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

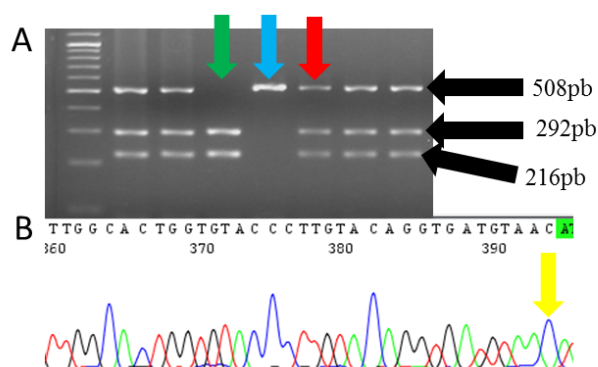


Figura 19 – Genotipagem do SNP *IL-10* C-819T (rs1800871). (A) Gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene *IL-10*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pb. A seta verde indica a amostra de indivíduo homozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo CC. A seta azul indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo TT. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo heterozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo CT. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *IL-10*, mostrando os alelos C em homozigose (seta amarela).

Anexo 10 – Protocolo de determinação do SNP *IL-10* C-592A

A amplificação do fragmento do gene *IL-10* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 µL contendo tampão para

PCR 1X, 2 mM de MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'- ATAAAATAGAGACGGTAGGG -3'; reverso: 5'- GGCTAAATATCCTCAAAGTT -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (269 pb) foi digerido com enzima de restrição foi digerido com enzima de restrição (FastDigest® RsaI, Thermo Scientific) à temperatura de 37°C durante 15 minutos, numa reação de volume final de 20 μL (10 μL do produto da amplificação, 2 μL de tampão FastDigest® 1X, 0,5 μL da enzima RsaI [5U] e 7,5 μL de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 μL do produto da RFLP adicionado de 1 μL do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio (10μg/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 100 pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

A enzima RsaI reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...GT↓AC...3'. Dessa forma, o fragmento de 269 pb contendo o alelo selvagem C em homozigose não apresenta sítio de restrição; o fragmento contendo o alelo mutante A em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 201 pb e 68 pb. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 20 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

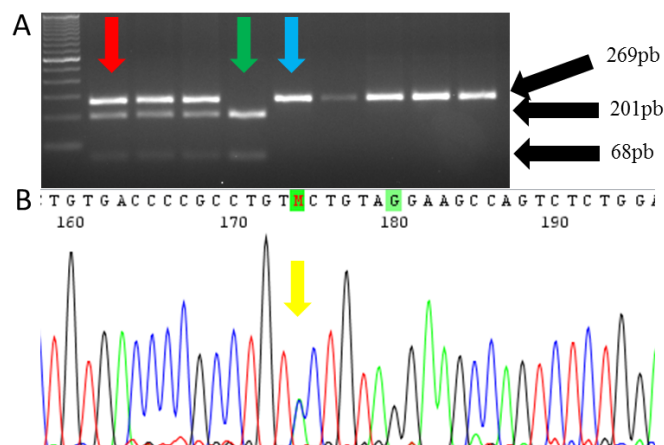


Figura 20 – Genotipagem do SNP *IL-10* C-592A (rs1800872). (A) Gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene *IL-10*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pb. A seta verde indica a amostra de indivíduo homocigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo AA. A seta azul indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo CC. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo heterocigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo CA. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *IL-10*, mostrando os alelos C e A em heterocigose (seta amarela).

Anexo 11 – Protocolo de determinação do SNP no gene codificador de PON1

A amplificação do fragmento do gene *PON1* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 μ L contendo tampão para PCR 1X, 2,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'- TGGGAGTTAGTTCTATGTGAGCC -3'; reverso: 5'- TGGTACAAATTCCTCATCTTGTC -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (991 pb) foi digerido com enzima de restrição (AlwI, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 37°C *overnight*, numa reação de volume final de 20 μ L (10 μ L do produto da amplificação, 2 μ L de NEBuffer 4 1X, 0,5 μ L da enzima AlwI [5U] e 7,5 μ L de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 μ L do produto da RFLP adicionado de 1 μ L do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio (10 μ g/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 250 pb.

A enzima AlwI reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...GGATC(N)₄↓...'. Dessa forma, o fragmento contendo o alelo mutante G em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 502 pb e 489 pb; o fragmento de 991 pb contendo o alelo selvagem A em homozigose não apresenta sítio de restrição. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 21 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

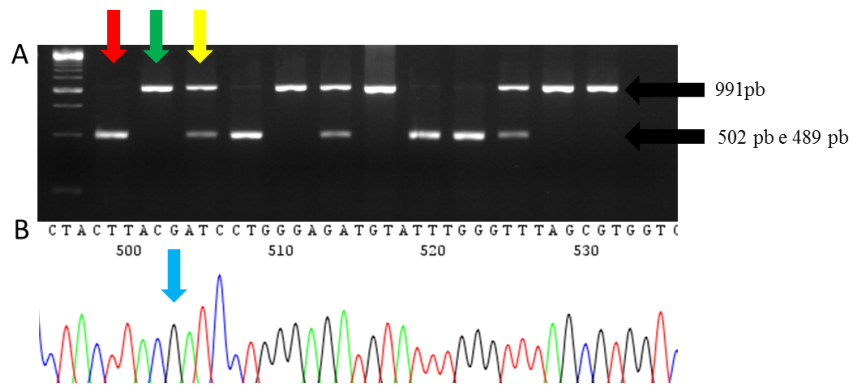


Figura 21 – Genotipagem da mutação PON1 Q192R (rs662). (A) Gel de agarose 2% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene *PON1*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 250 pb. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo homozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GG. A seta verde indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo AA. A seta amarela indica a amostra de indivíduo heterozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GA. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *PON1*, mostrando o alelo G em homozigose (seta azul).

Anexo 12 – Protocolo de determinação do SNP no gene codificador de TEK

A amplificação do fragmento do gene TEK foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 µL contendo tampão para PCR 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'- GCTTCTGGGAATGTTTGCTA -3'; reverso: 5'- GAGTTAATTTTCAGTTTGGGGC -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Na análise do polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP), o produto da amplificação da PCR (471 pb) foi digerido com enzima de restrição (FastDigest® DdeI, Thermo Scientific) à temperatura de 37°C durante 15 minutos, numa reação de volume final de 20 µL (10 µL do produto da amplificação, 2 µL de tampão FastDigest® 1X, 0,5 µL da enzima DdeI [5U] e 7,5 µL de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 µL do produto da RFLP adicionado de 1 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio (10µg/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 100 pb.

A enzima DdeI reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...C↓TNAG...3'. Dessa forma, o fragmento contendo o alelo selvagem G em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 340 pb e 131 pb; o fragmento contendo o alelo mutante C em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 197 pb, 143 pb e 131 pb. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 22 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

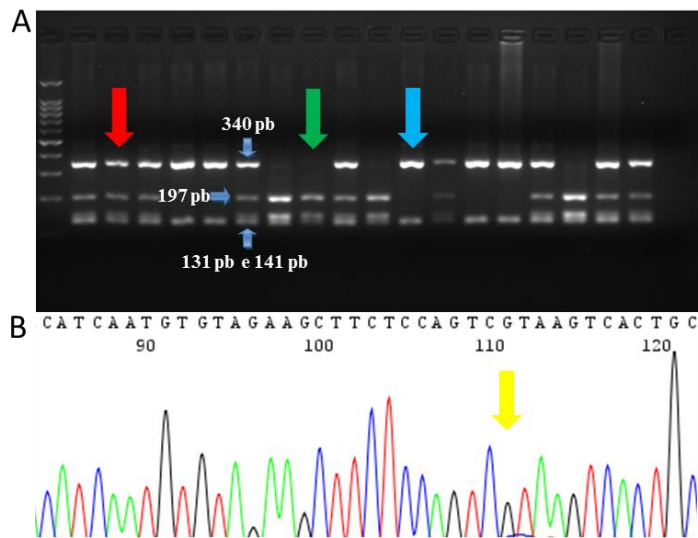


Figura 22 – Genotipagem do SNP em *TEK* rs489347 (A) Gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene de *TEK*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pb. A seta verde indica a amostra de indivíduo homocigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo CC. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo heterocigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GC. A seta azul indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GG. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *TEK*, mostrando o alelo mutante A em homocigose (seta amarela).

Anexo 13 – Protocolo de determinação do SNP no gene codificador de *TGFBR3*

A amplificação do fragmento do gene *TGFBR3* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 μ L contendo tampão para PCR 1X, 2,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'- TTGCCTAAACCTGGGAAGCA -3'; reverso: 5'- TTTTGGCATGGCCTTCAAAG -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 59°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (299 pb) foi digerido com enzima de restrição (*Hpy188I*, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 37°C *overnight*,

numa reação de volume final de 20 μ L (10 μ L do produto da amplificação, 2 μ L de tampão NEBuffer 4 1X, 0,5 μ L da enzima Hpy188I [5U] e 7,5 μ L de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 μ L do produto da RFLP adicionado de 1 μ L do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio (10 μ g/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 100 pb.

A enzima Hpy188I reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...TCN↓GA...3'. Dessa forma, o fragmento de 299 pb contendo o alelo selvagem C em homozigose não apresenta sítio de restrição; o fragmento contendo o alelo mutante T em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 181 pb e 118 pb. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 23 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

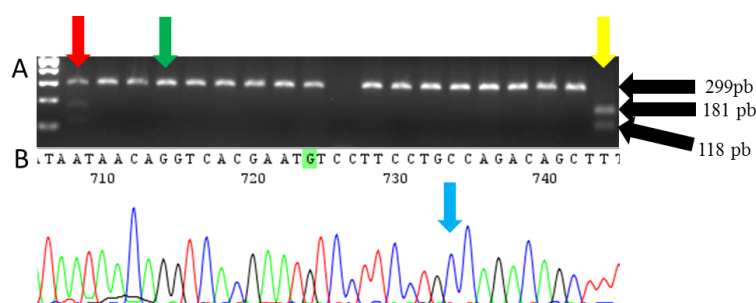


Figura 23 – Genotipagem do SNP *TGFR3* rs284875. (A) Gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene *TGFR3*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pb. A seta verde indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo CC. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo heterozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo CT. A seta amarela indica a amostra de indivíduo homozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo TT. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *TGFR3*, mostrando o alelo C em homozigose (seta azul).

Anexo 14 – Protocolo de determinação do SNP no gene codificador de TNF- α

A amplificação do fragmento do gene *TNF- α* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 μ L contendo tampão para PCR 1X, 2,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'- AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT -3'; reverso: 5'- TCCTCCCTGCTCCGATTCCG -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 60 segundos, 60°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos, mais uma fase de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (107 pb) foi digerido com enzima de restrição (NcoI, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 37°C *overnight*, numa reação de volume final de 20 μ L (10 μ L do produto da amplificação, 2 μ L de tampão NEBuffer 3 1X, 0,5 μ L da enzima NcoI [5U] e 7,5 μ L de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 μ L do produto da RFLP adicionado de 1 μ L do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio (10 μ g/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 50 pb.

A enzima NcoI reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...C↓CATGG...3'. Dessa forma, o fragmento contendo o alelo selvagem G em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 87 pb e 20 pb; o fragmento de 107 pb contendo o alelo mutante A em homozigose não apresenta sítio de restrição. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 24 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

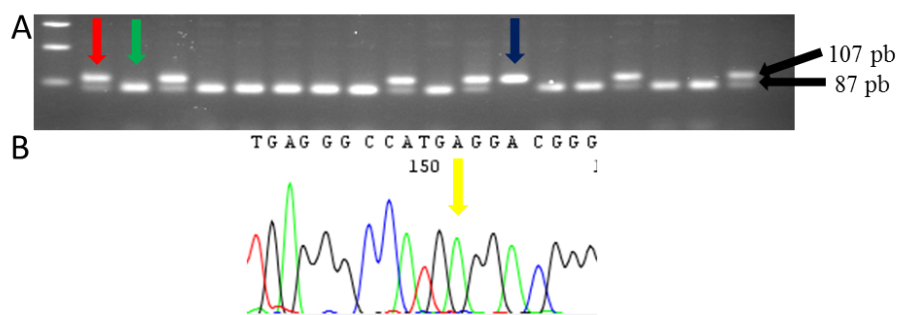


Figura 24 – Genotipagem do SNP *TNF- α* -308G>A (rs1800629). (A) Gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do fragmento do gene *TNF- α* . Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pares de base. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo heterozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GA. A seta verde indica a amostra de indivíduo homozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GG. A seta azul indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo AA. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *TNF- α* , mostrando o alelo mutante A em homozigose (seta amarela).

Anexo 15 – Protocolo de determinação do SNP no gene codificador de VCAM-1

A amplificação do fragmento do gene *VCAM-1* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 μ L contendo tampão para PCR 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'- CGTTTTTGCTTGCGATTG -3'; reverso: 5'- CCAGTATCTTCAATGGTAGGGATG -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, mais uma fase de extensão final de 3 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (251 pb) foi digerido com enzima de restrição (Cac8I, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 37°C *overnight*, numa reação de volume final de 20 μ L (10 μ L do produto da amplificação, 2 μ L de tampão NEBuffer 4 1X, 0,4 μ L da enzima Cac8I [2U] e 7,6 μ L de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 μ L do produto da RFLP adicionado de 1 μ L do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio (10 μ g/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi

visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 100 pb.

A enzima *Cac8I* reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...GCN↓NGC...3'. Dessa forma, o fragmento de 251 pb contendo o alelo selvagem G (selvagem) em homozigose não apresenta sítio de restrição; o fragmento contendo o alelo mutante C em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 195 pb e 56 pb. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 25 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

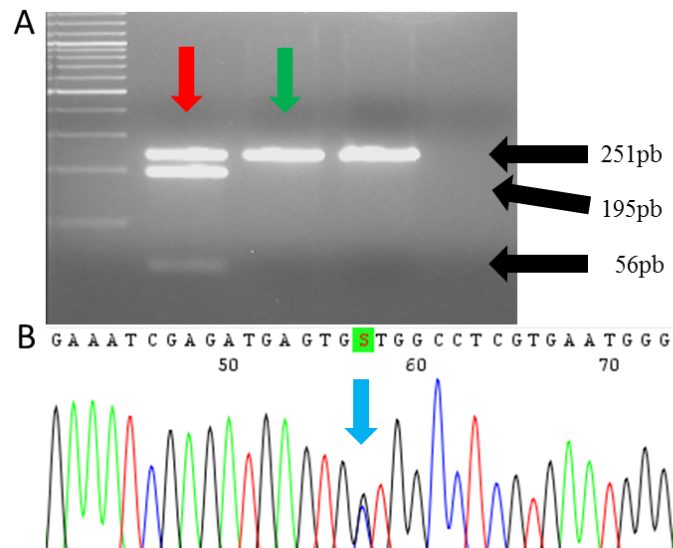


Figura 25 – Genotipagem do SNP *VCAM-1* c.1238G>C (rs3783613). (A) Gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene *VCAM-1*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pb. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo heterozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GC. A seta verde indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GG. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *VCAM-1*, mostrando os alelos G e C em heterozigose (seta azul).

Anexo 16 – Protocolo de diagnóstico molecular de HPFH 1, HPFH 2 e HPFH 3

Deleção HPFH 1

A amplificação do fragmento do agrupamento de genes da beta globina referente à HPFH 1 foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 µL contendo tampão para PCR 1X, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'-AGAATGTCACACTTAGAATGTG -3'; reverso: 5'-CACTTTAATTCTGTTCTACCTGAA -3'; reverso: 5'-ACTGTGATGTTGGAAATGGAC -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 60 segundos, 55°C por 60 segundos e 72°C por 90 segundos, mais uma fase de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Para visualização dos produtos da PCR, 10 µL produto adicionado de 1 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio (10µg/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 90 volts, durante 120 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos para presença ou ausência da deleção foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados na amplificação, quando comparados com o padrão de peso molecular 250 pb (Figura 26).

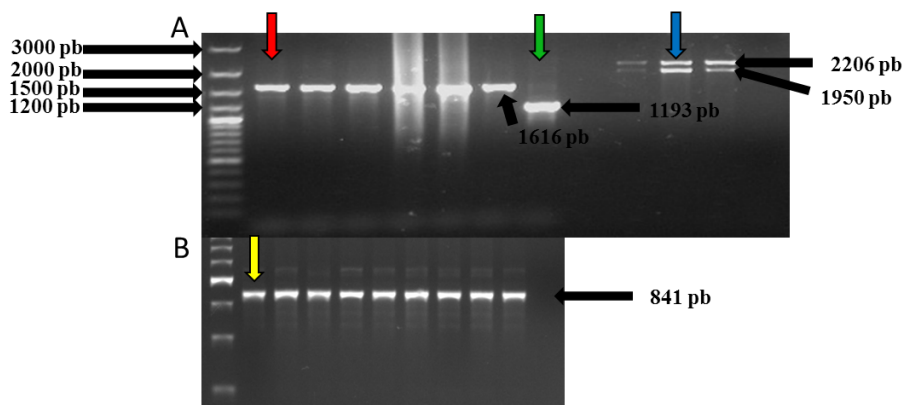


Figura 26 – Genotipagem de deleções que causam Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal (HPFH). (A) Fotografia do gel de agarose 1% contendo produtos de *gap-PCRs* para HPFH 1 e 2. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular. A seta vermelha indica um indivíduo homocigoto selvagem para HPFH-1. A seta verde indica um controle positivo homocigoto mutante para HPFH-1. A seta azul indica um indivíduo heterocigoto para HPFH -2. (B) Fotografia do gel de agarose 1% contendo produtos de *gap-PCR* para HPFH 3. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 250 pares de base. A seta amarela indica um indivíduo homocigoto selvagem para HPFH-3.

Homocigotos selvagens apresentaram amplificação de um fragmento de 1616 pb; homocigotos mutantes, apresentaram amplificação de um fragmento de 1193 pb. Os heterocigotos apresentaram amplificação de ambos os fragmentos de 1616 pb e 1193 pb.

Deleção HPFH 2

A amplificação do fragmento do agrupamento de genes da beta globina referente à HPFH 2 foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 μ L contendo tampão para PCR 1X, 1,25 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 10 pmoles dos oligonucleotídeos sintéticos direto 5'-GACATGGACTATTGTTCAATGA -3' e reverso 5'-TTTATATATGAAATGCTACTGATT -3', 2 pmoles do oligonucleotídeo sintético reverso 5'-TGCTATGCCAACTCACTACC -3' e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador (Veriti, Applied Biosystems) com uma fase inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 60 segundos, 55°C por 60 segundos e 72°C por 90 segundos, mais uma fase de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Para visualização dos produtos da PCR, 10 μ L do produto adicionado de 1 μ L do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio (10 μ g/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 90 volts, durante

120 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos para presença ou ausência da deleção foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados na amplificação, quando comparados com o padrão de peso molecular 250 pb (Figura 26).

Homozigotos selvagens apresentaram amplificação de um fragmento de 2206 pb; homozigotos mutantes, apresentaram amplificação de um fragmento de 1950 pb. Os heterozigotos apresentaram amplificação de ambos os fragmentos de 2206 pb e 1950 pb.

Deleção HPFH 3

A amplificação do fragmento do agrupamento de genes da beta globina referente à HPFH 3 foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 µL contendo tampão para PCR 1X, 1,25 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'-GACATGGACTATTGTTCAATGA -3'; reverso: 5'-CTTTGCTGTTCAGGCTTAATTT -3'; reverso: 5'-GACACAGAGCAGTGATTGGTGCA -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 60 segundos, 59°C por 60 segundos e 72°C por 120 segundos, mais uma fase de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Para visualização dos produtos da PCR, 10 µL do produto adicionado de 1 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio (10µg/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 90 volts, durante 120 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos para presença ou ausência da deleção foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados na amplificação, quando comparados com o padrão de peso molecular 250 pb (Figura 26).

Homozigotos selvagens apresentaram amplificação de um fragmento de 841 pb; homozigotos mutantes, apresentaram amplificação de um fragmento de 607 pb. Os heterozigotos apresentaram amplificação de ambos os fragmentos de 841 pb e 607 pb.

Anexo 17 – Protocolo de determinação da isoforma de G6PD

A amplificação do fragmento do gene *G6PD* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 µL contendo tampão para PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 5 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'- TGGCCAGTACGATGATGCAG -3'; reverso: 5'- GGCCAGGTAGAAGAGGCGGT -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, mais uma fase de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (90 pb) foi digerido com enzima de restrição (FastDigest® FokI, Thermo Scientific) à temperatura de 37°C durante 15 minutos, numa reação de volume final de 20 µL (10 µL do produto da amplificação, 2 µL de tampão FastDigest® 1X, 0,5 µL da enzima FokI [5U] e 7,5 µL de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 10 µL do produto da RFLP adicionado de 1 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de poliacrilamida 12%. A corrida de eletroforese foi realizada a 90 volts, durante 120 minutos em TBE 1X. Após o término da eletroforese, o gel foi corado utilizando solução contendo brometo de etídio (0,01µg/mL). Em seguida, o gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 50 pb.

A enzima FokI reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...GGATG(N)₉↓...3'. Dessa forma, o fragmento de 90 pb contendo o alelo selvagem A em homozigose não apresenta o sítio de restrição; o fragmento contendo o alelo mutante G em homozigose

quando clivado, gera fragmentos de 58 pb e 32 pb. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 27 mostra a fotografia de um gel de poliacrilamida contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

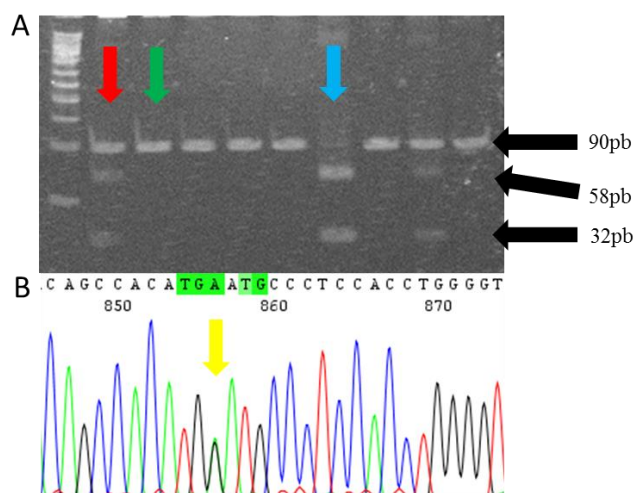


Figura 27 – Genotipagem da variante G6PD A376G (rs1050829). (A) Gel de poliacrilamida 12% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene *G6PD*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 50 pb. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo heterozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo AG. A seta verde indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo AA. A seta azul indica a amostra de indivíduo homozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GG. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *G6PD*, mostrando os alelos G e A em heterozigose (seta amarela).

Anexo 18 – Protocolo de determinação do SNP *G6PD G202A*

A amplificação do fragmento do gene *G6PD* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 µL contendo tampão para PCR, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 5 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'- GTGGCTGTTCCGGGATGGCCTTCTG -3'; reverso: 5'- CTTGAAGAAGGGCTCACTCTGTTT -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 61°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, mais uma fase de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (109 pb) foi digerido com enzima de restrição (NlaIII, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 37°C *overnight*, numa reação de volume final de 20 µL (10 µL do produto da amplificação, 2 µL de tampão NEBuffer 4 1X, 0,5 µL da enzima NlaIII [5U] e 7,5 µL de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 10 µL do produto da RFLP adicionado de 1 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de poliacrilamida 12%. A corrida de eletroforese foi realizada a 90 volts, durante 120 minutos em cuba contendo TBE 1X. Após o término da eletroforese, o gel foi corado utilizando solução contendo brometo de etídio (0,01µg/mL). Em seguida, o gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 50 pb.

A enzima NlaIII reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...CATG↓...3'. Dessa forma, o fragmento de 109 pb contendo o alelo selvagem G (selvagem) em homozigose não apresenta sítio de restrição; o fragmento contendo o alelo mutante A em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 63 pb e 46 pb. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 28 mostra a fotografia de um gel de poliacrilamida contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

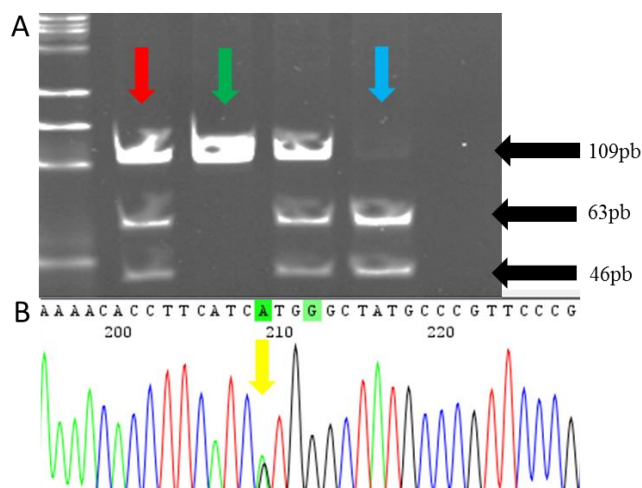


Figura 28 – Genotipagem da variante G6PD G202A (rs1050828). (A) Gel de poliacrilamida 12% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene *G6PD*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 50 pb. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo heterozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GA. A seta verde indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo GG. A seta azul indica a amostra de indivíduo homozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo AA. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *G6PD*, mostrando os alelos G e A em heterozigose (seta amarela).

Anexo 19 – Protocolo de determinação do SNP *G6PD T968C*

A amplificação do fragmento do gene *G6PD* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 μ L contendo tampão de PCR 1X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 5 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'- TCCCTGCACCCCAACTCAAC -3'; reverso: 5'- CCAGTTCTGCCTTGCTGGGC -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 65°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, mais uma fase de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (282 pb) foi digerido com enzima de restrição (FastDigest® NciI, Thermo Scientific) à temperatura de 37°C durante 15 minutos, numa reação de volume final de 20 μ L (10 μ L do produto da amplificação, 2 μ L de tampão FastDigest® 1X, 0,5 μ L da enzima NciI [5U] e 7,5 μ L de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 μ L do produto da RFLP adicionado de 1 μ L do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de

agarose 3% contendo brometo de etídio (10µg/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 100 pb.

A enzima NciI reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...CC↓SGG...3'. Dessa forma, o fragmento de 282 pb contendo o alelo selvagem T em homozigose não apresenta sítio de restrição; o fragmento contendo o alelo mutante C em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 162 pb e 120 pb. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 29 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

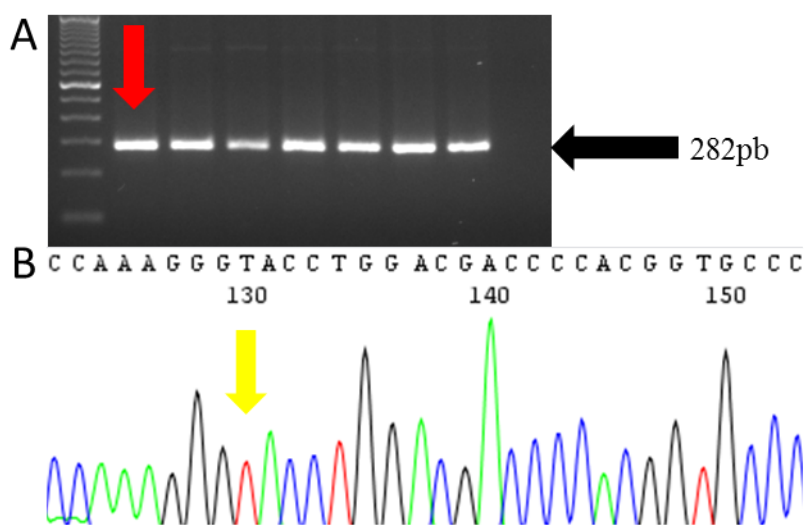


Figura 29 – Genotipagem da variante G6PD A- T968C (rs76723693). (A) Gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene de *G6PD*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pb. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição, caracterizando o genótipo TT. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *G6PD*, mostrando o alelo T em homozigose (seta amarela).

Anexo 20 – Protocolo de determinação do SNP *G6PD G680T*

A amplificação do fragmento do gene *G6PD* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 µL contendo tampão para PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 5 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'- ACATGTGGCCCCTGCACCAC -3'; reverso: 5'- GTGACTGGCTCTGCCACCCTG -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 69°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, mais uma fase de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (242 pb) foi digerido com enzima de restrição (BstNI, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 37°C *overnight*, numa reação de volume final de 20 µL (10 µL do produto da amplificação, 2 µL de tampão NEBuffer 4 1X, 0,5 µL da enzima BstNI [5U] e 7,5 µL de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 µL do produto da RFLP adicionado de 1 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio (10µg/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 100 pb.

A enzima BstNI reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...CC↓WGG...'. Dessa forma, o fragmento contendo o alelo selvagem G em homozigose quando clivado, gera fragmentos 213 pb e 29 pb; o fragmento contendo do alelo mutante T em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 115 pb, 98 pb e 29 pb. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 30 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

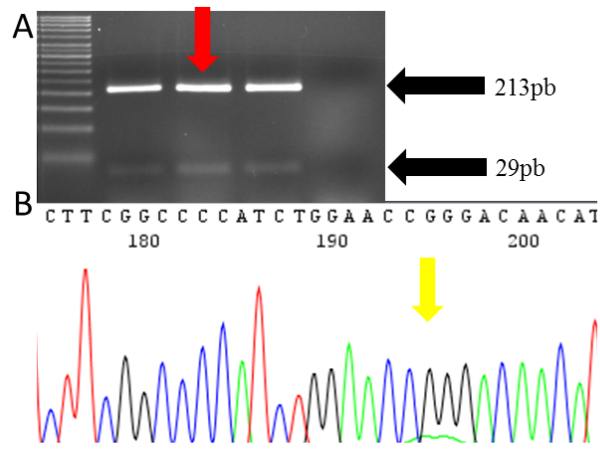


Figura 30 – Genotipagem da variante G6PD A- G680T (rs137852328). (A) Gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene de *G6PD*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 50 pb. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição na posição rs137852328, caracterizando o genótipo GG. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *G6PD*, mostrando o alelo G em homozigose (seta amarela).

Anexo 21 – Protocolo de determinação do SNP *G6PD A542T*

A amplificação do fragmento do gene *G6PD* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 μ L contendo tampão para PCR 1X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 5 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'- TGGCCAGTACGATGATGCAG -3'; reverso: 5'- GTGACTGGCTCTGCCACCCTG -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 69°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, mais uma fase de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (1347 pb) foi digerido com enzima de restrição (AhdI, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 37°C *overnight*, numa reação de volume final de 20 μ L (10 μ L do produto da amplificação, 2 μ L de tampão NEBuffer 4 1X, 1 μ L da enzima AhdI [10U] e 7 μ L de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 μ L do produto da RFLP adicionado de 1 μ L do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de

agarose 2% contendo brometo de etídio (10µg/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 250 pb.

A enzima AhdI reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...CC↓WGG...3'. Dessa forma, o fragmento contendo o alelo selvagem A em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 891 pb e 456 pb; o fragmento de 1347 pb contendo o alelo mutante T em homozigose não apresenta sítio de restrição. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 31 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

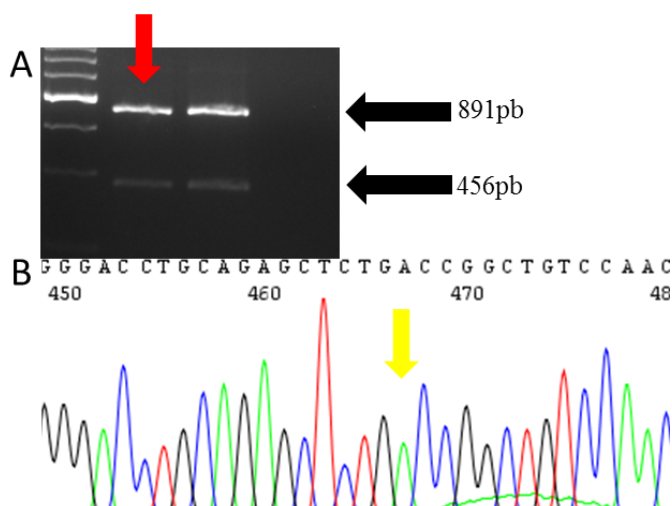


Figura 31 – Genotipagem da variante G6PD A- A542T (rs5030872). (A) Gel de agarose 2% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene de *G6PD*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 250 pb. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo homozigoto para o sítio de restrição, caracterizando o genótipo AA. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *G6PD*, mostrando o alelo A em homozigose (seta amarela).

Anexo 22 – Protocolo de determinação do SNP *G6PD C563T*

A amplificação do fragmento do gene *G6PD* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 µL contendo tampão para PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 5 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'- TGGCCAGTACGATGATGCAG -3'; reverso: 5'- GTGACTGGCTCTGCCACCCTG -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase. A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 69°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, mais uma fase de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (1347 pb) foi digerido com enzima de restrição (BseRI, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 37°C *overnight*, numa reação de volume final de 20 µL (10 µL do produto da amplificação, 2 µL de tampão NEBuffer 4 1X e 0,7 µL da enzima BseRI [7U] e 7,3 µL de água tipo I).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 µL do produto da RFLP adicionado de 1 µL do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio (10µg/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 250 pb.

A enzima BseRI reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...GAGGAG(N)₁₀↓... '3. Dessa forma, o fragmento contendo o alelo selvagem C (selvagem) em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 516 pb, 450 pb, 219 pb e 162 pb; o fragmento contendo o alelo mutante T em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 612 pb, 516 pb e 219 pb. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 32 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

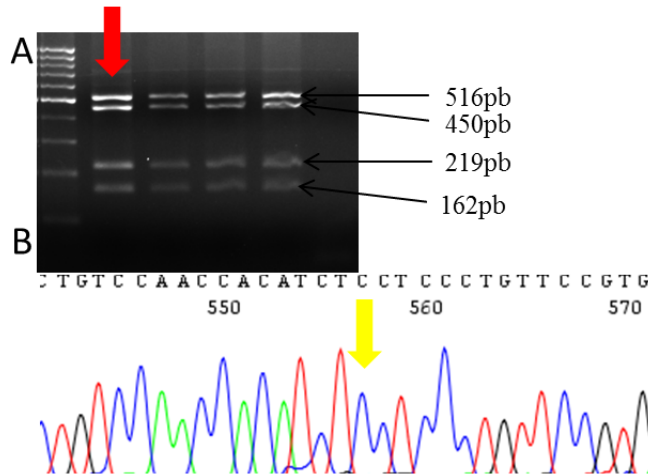


Figura 32 – Genotipagem da variante *G6PD* C563T (rs5030868). (A) Gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene de *G6PD*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pb. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo sem o sítio de restrição na posição rs5030868, caracterizando o genótipo CC. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *G6PD*, mostrando o alelo C em homozigose (seta amarela).

Anexo 23 – Protocolo de determinação do SNP *G6PD* G844C

A amplificação do fragmento do gene *G6PD* foi feita utilizando 50 ng de DNA genômico como molde numa reação com volume final de 10 μ L contendo tampão para PCR 1X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 5 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético (direto: 5'- ACATGTGGCCCCTGCACCAC -3'; reverso: 5'- CCAGTTCTGCCTTGCTGGGC -3') e 0,5 U de Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A reação de amplificação foi feita em termociclador com uma fase inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 69°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, mais uma fase de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Na RFLP, o produto da amplificação da PCR (1319 pb) foi digerido com enzima de restrição (Hpy188I, New England BioLabs Inc.) à temperatura de 37°C *overnight*, numa reação de volume final de 20 μ L (10 μ L do produto da amplificação, 2 μ L de tampão NEBuffer 4 1X, 0,8 μ L da enzima Hpy188I [8U] e 7,2 μ L de água deionizada e autoclavada).

Para visualização dos produtos da restrição, 20 μ L do produto da RFLP adicionado de 1 μ L do tampão de corrida xileno cianol 5X foram aplicados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídio (10 μ g/mL). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 volts, durante 90 minutos em cuba contendo tampão TAE 1X. O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta para análise dos fragmentos amplificados. Genótipos homozigotos e heterozigotos foram determinados pelo tamanho dos fragmentos gerados pela restrição, quando comparados com o padrão de peso molecular 250 pb.

A enzima Hpy188I reconhece e cliva o sítio de restrição 5'...TCN↓GA...'3. Dessa forma, o fragmento contendo o alelo selvagem G em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 312 pb, 305 pb, 219 pb, 201 pb, 142 pb, 131 pb e 9 pb; o fragmento contendo o alelo mutante C em homozigose quando clivado, gera fragmentos de 447 pb, 312 pb, 219 pb, 201 pb, 131 pb e 9 pb. O genótipo heterozigoto é identificado pela presença de todos os fragmentos. A figura 33 mostra a fotografia de um gel de agarose contendo o resultado da PCR/RFLP utilizando a técnica descrita neste item, bem como o resultado do sequenciamento de DNA para confirmação do resultado obtido.

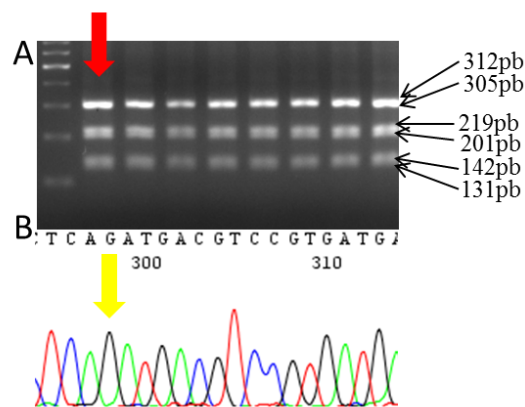


Figura 33 – Genotipagem da variante G6PD G844C. (A) Gel de agarose 3% contendo produtos da RFLP do fragmento amplificado do gene *G6PD*. Na canaleta 1 foi aplicado o padrão de peso molecular em escala de 100 pb. A seta vermelha indica a amostra de indivíduo com o sítio de restrição na posição G844C, caracterizando o genótipo GG. (B) Eletroferograma referente ao sequenciamento de quatro cores do fragmento do gene *G6PD*, mostrando o alelo G em homozigose (seta amarela).

Anexo 24 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96

Título da Pesquisa: Predizendo o risco de ocorrência de doença cerebrovascular em crianças com anemia falciforme: análise da influência de fatores genéticos, laboratoriais e clínicos

A anemia falciforme é uma doença do sangue causada pela alteração na forma das hemácias, que ficam parecidas com uma foice, ao invés de ter a forma normal, arredondada. Ela é uma doença genética, ou seja, o pai e a mãe podem transmitir para os filhos o gene alterado (hemoglobina S) que causará a doença. A anemia falciforme causa diferentes sintomas nos pacientes. Alguns casos são mais leves e outros, mais graves. A gravidade da doença depende de fatores ambientais e características genéticas dos indivíduos. A doença cerebrovascular é uma das manifestações clínicas mais graves da anemia falciforme, que ocorre em cerca de 30% das crianças. Nosso objetivo é estudar algumas características, como dados clínicos (condições dos vasos cerebrais, do pulmão, coração e outros órgãos), dados laboratoriais (composição do sangue, quantidade de oxigênio no sangue, nível de enzimas e outros) e fatores genéticos (como a talassemia alfa, polimorfismos genéticos e outros), que possam influenciar na ocorrência de doença cerebrovascular. Alguns resultados poderão ajudar o médico a conhecer quais os pacientes teriam maior risco de ter a doença cerebrovascular e, assim, orientá-lo no tratamento mais adequado para evitar as possíveis complicações.

É por isso que nós pedimos sua autorização para incluir seu(sua) filho(a) neste estudo. Caso você autorize, você não terá nenhum custo. Iremos colher um pouco de sangue da veia (5 ml) da criança para realização dos testes. A coleta de sangue será feita por um profissional treinado, mas, em alguns casos pode deixar um hematoma (coloração roxa) na região do braço onde a agulha foi introduzida. Caso seja feita uma coleta de sangue para exames referentes ao acompanhamento clínico, esta mesma amostra poderá ser usada para nossa pesquisa, sem necessidade de nova coleta. O material coletado ficará guardado no Laboratório de Pesquisa da Fundação Hemominas e será usado apenas para os fins propostos nesta pesquisa. Será necessário coletar dados no prontuário da criança. Além disso, faremos a avaliação dos vasos sanguíneos cerebrais através do ultrassom transcraniano, um exame simples que não provoca dor, para detecção de doença neurológica. Outro exame bem simples que será realizado é a quantificação de oxigênio no sangue, através do oxímetro de pulso. Estes exames serão realizados no Ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte, como parte da avaliação clínica. Na divulgação dos resultados, o nome da pessoa não será mostrado, garantindo todo sigilo e privacidade da criança. Também é importante esclarecer que você tem toda a liberdade para decidir se quer ou não autorizar a participação do seu (sua) filho(a) nesta pesquisa. Se você não autorizar, ele não será prejudicado no atendimento, e se desistir durante a pesquisa, não sofrerá nenhum prejuízo.

Caso você autorize, o material genético (DNA) recolhido para este estudo poderá ser usado pelos mesmos pesquisadores envolvidos nesta pesquisa em futuras investigações com objetivos semelhantes: investigar marcadores genéticos que podem ter influência nas manifestações clínicas da anemia falciforme. Neste caso, a amostra da

criança será conservada sem prazo para descarte (**Banco de Amostras**). Entretanto, o uso futuro deste material nunca será ligado a nenhum dado pessoal do participante. Você pode negar a permissão para o uso da amostra em estudos futuros, e ainda participar deste projeto. Se você autorizar o uso futuro da amostra da criança, qualquer novo estudo utilizando esta amostra deverá ser avaliado e autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação. Se a nova pesquisa não trazer benefícios ou riscos para o participante, você não será informado sobre seu uso.

Qualquer dúvida que você tiver, fale com Cibele Velloso Rodrigues, no telefone 3248-4535, nos horários de 9:00 às 16:00h, ou com o Professor Marcos Borato Viana, no telefone 3409-9773.

Eu, _____, responsável pelo menor _____, após esclarecimentos, autorizo o pesquisador a incluí-lo(a) neste estudo.

Assinatura do responsável

Data:

Rua:

Bairro:

Cidade:

CEP:

Telefone:

Quanto ao Banco de Amostras, marque com um X no quadrado abaixo sua decisão:

Aceito que os pesquisadores guardem a amostra coletada para uso em estudos futuros.

NÃO aceito que os pesquisadores guardem a amostra coletada para uso em estudos futuros.

Assinatura do pesquisador:

Local: _____

Data: ____/____/____

Pesquisadores responsáveis: André Rolim Belisário, Célia Maria Silva, Cibele Velloso Rodrigues e Marcos Borato Viana.

Serviço de Pesquisa – Fundação HEMOMINAS: 31-3248-4535

Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas: 31-3248-4587

COEP/ UFMG – COMITÊ DE ETICA EM PESQUISA

Av. Presidente Antônio Carlos 6627, Unidade Administrativo II, 2º andar, sala 2005.
CEP: 31.270-901 – BH – MG / TEL: 3409-4592 / coep@prpq.ufmg

Anexo 25 – Parecer do COEP UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP


Parecer nº. ETIC 0154.0.203.215-11

Interessado(a): Prof. Marcos Borato Viana
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 01 de junho de 2011, o projeto de pesquisa intitulado "Predizendo o risco de ocorrência de doença cerebrovascular em crianças com anemia falciforme: análise da influência de fatores genéticos, laboratoriais e clínicos" e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Maria Teresa Marques Amatal
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo 26 – Parecer do CEP Hemominas



Belo Horizonte, 10 de dezembro de 2010.

OFÍCIO Nº 115 / 2010
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Prezado Senhor Pesquisador, André Rolim Belisário

Encaminhamos o parecer substanciado referente ao seu projeto de pesquisa “Predizendo o risco de ocorrência de doença cerebrovascular em crianças com anemia falciforme: análise de influência de fatores genéticos, laboratoriais e clínicos”, nº de registro 295. Seu projeto foi aprovado por nosso Comitê, e então, a partir deste momento, sua pesquisa pode ser desenvolvida no âmbito da Fundação Hemominas.

Desejamos boa sorte e sucesso em seu estudo.

Atenciosamente,

Simone das Virgens
Simone das Virgens

secretária do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Hemominas

Anexo 27 – Parecer do CEP Hemominas referente ao projeto de identificação das mutações causadoras de talassemia beta



Belo Horizonte, 09 de setembro de 2011

OFÍCIO Nº 78 / 2011
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Prezado Senhor Pesquisador, André Rolim Belisário

Encaminhamos o parecer substanciado referente ao seu projeto de pesquisa “Identificação das mutações causadoras de talassemia beta heterozigóticas associada à hemoglobina S em crianças triadas pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais e Assistidas no Hemocentro de Belo Horizonte na Fundação Hemominas.” nº de registro 310. Seu projeto foi aprovado por nosso Comitê, e então, a partir deste momento, sua pesquisa pode ser desenvolvida no âmbito da Fundação Hemominas.

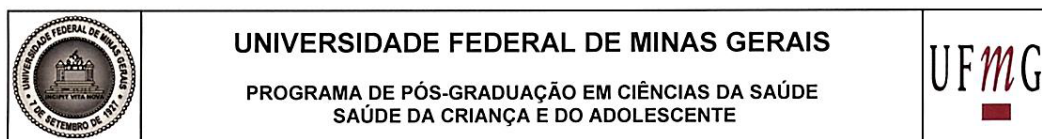
Desejamos boa sorte e sucesso em seu estudo.

Atenciosamente,

Simone das Virgens
Simone das Virgens

secretária do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Hemominas

Anexo 28 – Folha de aprovação



FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE MARCADORES GENÉTICOS, LABORATORIAIS E CLÍNICOS NA OCORRÊNCIA DE DOENÇA CEREBROVASCULAR EM CRIANÇAS COM ANEMIA FALCIFORME TRIADAS PELO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS E ACOMPANHADAS NO HEMOCENTRO DE BELO HORIZONTE DA FUNDAÇÃO HEMOMINAS

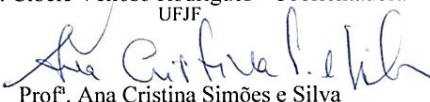
ANDRE ROLIM BELISARIO


Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Ciências da Saúde.

Aprovada em 29 de junho de 2015, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Marcos Borato Viana - Orientador
UFMG


Prof. Cibele Velloso Rodrigues - Coorientadora
UFJF


Prof. Ana Cristina Simões e Silva
UFMG



Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior
UFMG


Prof. Maria Stella Figueiredo
UNIFESP


Prof. Fernando Ferreira Costa
UNICAMP

Belo Horizonte, 29 de junho de 2015.

Anexo 29 – Ata da defesa de tese

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE	UFMG
---	--	-------------

ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO
ANDRE ROLIM BELISARIO

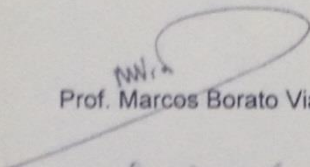
Realizou-se, no dia 29 de junho de 2015, às 14:00 horas, sala 029, andar térreo da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada "AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE MARCADORES GENÉTICOS, LABORATORIAIS E CLÍNICOS NA OCORRÊNCIA DE DOENÇA CEREBROVASCULAR EM CRIANÇAS COM ANEMIA FALCIFORME TRIADAS PELO PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DE MINAS GERAIS E ACOMPANHADAS NO HEMOCENTRO DE BELO HORIZONTE DA FUNDAÇÃO HEMOMINAS", apresentada por ANDRE ROLIM BELISARIO, número de registro 2011655719, graduado no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, à seguinte Comissão Examinadora formada pelos Professores Doutores: Marcos Borato Viana - Orientador (UFMG), Cibele Velloso Rodrigues (UFJF), Ana Cristina Simões e Silva (UFMG), Antônio Lúcio Teixeira Júnior (UFMG), Maria Stella Figueiredo (UNIFESP) e Fernando Ferreira Costa (UNICAMP).

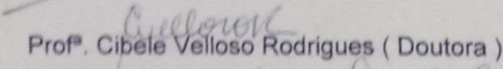
A Comissão considerou a tese:

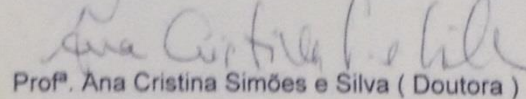
Aprovada

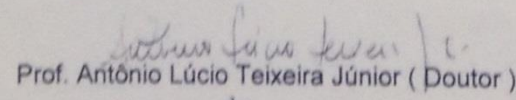
Reprovada

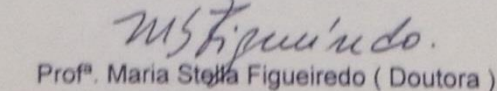
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 29 de junho de 2015.

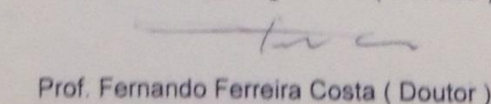

Prof. Marcos Borato Viana (Doutor)


Prof. Cibele Velloso Rodrigues (Doutora)


Prof. Ana Cristina Simões e Silva (Doutora)


Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior (Doutor)


Prof. Maria Stella Figueiredo (Doutora)


Prof. Fernando Ferreira Costa (Doutor)

