



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS
EM SAÚDE

Kleyton Palmeira Do Ó

**Avaliação dos polimorfismos e expressão dos genes das
metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) nos eventos vaso-
occlusivos em jovens com anemia falciforme.**

Recife

2023

Kleyton Palmeira Do Ó

Avaliação dos polimorfismos e expressão dos genes das metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) nos eventos vaso-oclusivos em jovens com anemia falciforme.

Tese de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Ph.D, Luydson Richardson Silva Vasconcelos.

Coorientador: Ph.D, Taciana Furtado de Mendonça Belmont.

Recife

2023

Título do trabalho em inglês: Evaluation of polymorphisms and gene expression of metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in vaso-occlusive events in young people with sickle cell anemia.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - Código de Financiamento 001.

O11 Ó, Kleyton Palmeira do.
Avaliação dos polimorfismos e expressão dos genes das metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) nos eventos vasooclusivos em jovens com anemia falciforme / Kleyton Palmeira do Ó. -- 2023.
155 p. : il.color.

Orientador: Luydson Richardson Silva Vasconcelos.
Coorientadora: Taciana Furtado de Mendonça Belmont.
Tese (Doutorado em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Instituto Aggeu Magalhães, 2023.
Bibliografia: f. 76-91.

1. Anemia Falciforme. 2. Metaloproteinase. 3. MMP. 4. Polimorfismo. I.
Título.

CDU 575.112

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Adagilson Batista Bispo da Silva - CRB-1239
Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos

Kleyton Palmeira do Ó

Avaliação dos polimorfismos e expressão dos genes das metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) nos eventos vaso-oclusivos em jovens com anemia falciforme.

Tese de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 10 de Abril de 2023

BANCA EXAMINADORA

Dr. Walter Lins Barbosa Júnior
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Chistian Robson de Souza Reis
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Matheus Filgueira Bezerra Vasconcelos
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz



Assinado de forma digital por Luydson
Richardson Silva Vasconcelos:01063888433
Dados: 2023.08.28 14:20:20 -03'00'

Dr. Luydson Richardson Silva
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz



Assinado de forma digital por Fabio
Lopes de Melo:53940822434
Dados: 2023.08.28 14:40:25 -03'00'

Dr. Fábio Lopes de Melo
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as portas que foram abertas durante este processo, por colocar pessoas boas em meu caminho.

Aos pacientes participaram da pesquisa por sua disponibilidade, pois sem esses o trabalho não teria sido elaborado, muito obrigado!

A minha família, que sempre acreditou e torceu por mim.

A minha companheira, Rúbia, pelo amor, compreensão, apoio e incentivo, por sempre estar ao meu lado e impedindo que eu desistisse durante os momentos difíceis.

Faço um agradecimento em especial para meu orientador Dr. Luydson Vasconcelos, que me deu oportunidade e acompanhou de perto e esteve disponível para elaboração deste trabalho. Além disso agradeço a Taciana Belmont (minha coorientadora) e Profa. Dra. Maria do Socorro Cavalcanti que me acolheram desde a iniciação científica. Agradeço a vocês por todo apoio, ensinamentos, paciência, carinho, inspiração, amizade e toda contribuição na minha formação profissional e pessoal.

Agradeço aos amigos que fiz neste período, à Débora e Roberta (que me ajudaram no projeto, além de compartilhar os apertados da vida na pós graduação). Também a todos os colegas de laboratório e departamento de pesquisa.

Ao programa de pós graduação BBS da FioCruz-PE pelo apoio e oportunidade, pelo fornecimento da bolsa de pesquisa. Também agradeço aos órgãos de fomento, como a CAPES, pelo financiamento deste trabalho.

Ao Hospital de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Fundação Hemope).

Ao Prof. Dr. Marcos André Bezerra, e seus alunos, pelo suporte no desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros participantes da banca avaliadora desse projeto.

Por fim, peço desculpas se o cansaço me fez esquecer de alguém, mas serei eternamente grato a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Faça o teu melhor, nas condições que você tem, enquanto você não tem condições melhores para fazer melhor ainda”.

Mário Sergio Cortella

RESUMO

Ó, Kleyton Palmeira do. Avaliação Dos Polimorfismos e Expressão Dos Genes Das Metaloproteinases (MMPs) E Seus Inibidores (TIMPs) Nos Eventos Vaso-Oclusivos Em Jovens Com Anemia Falciforme. 2023. Tese (Doutorado) - Instituto Aggeu Magalhães, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências em Saúde, Recife, 2023.

A anemia falciforme (AF) provoca manifestações inflamatórias crônicas, em que a oclusão vascular e hemólise desencadeiam a maioria dos sinais e sintomas presentes nos pacientes. Moléculas como as metaloproteinases de matriz (MMPs), e seu inibidores teciduais endógenos (TIMPs) que atuam nos processos de proliferação, diferenciação, motilidade, apoptose, angiogênese e adesão, podem exercer influência na regulação dos eventos vaso-oclusivos (EVO) e inflamatórios na AF. Assim, polimorfismos genéticos (SNPs) nessas proteínas podem modificar seus níveis de expressão e, quando associados a AF, desempenhando papel de biomarcadores. O objetivo deste estudo foi avaliar os polimorfismos nos genes *MMP1* 1G/2G (rs1799750); *MMP2*-1306 C/T (rs2285053 e rs243865), *MMP9* C/T (rs17576), *TIMP1*+372 C/T (rs4898) e *TIMP2*-418 G/C (rs7501477), juntamente com a expressão das MMPs e seus inibidores e sua relação com os EVOs na AF. Os métodos para o desenvolvimento deste trabalho incluíram coleta de amostra biológica de 251 pacientes com AF para extração de DNA genômico e mRNA; a partir da genotipagem e ensaio de expressão por PCR em tempo real, respectivamente. Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos dos prontuários dos pacientes, disponibilizados pelo Hospital de Hemoterapia de Pernambuco (Hemope). Este estudo foi caracterizado como transversal com grupos de comparação. Os grupos foram divididos de acordo os eventos vaso-oclusivos (CVO), Acidente vascular encefálico (AVE) e doença cerebrovascular (CVD), comparado a indivíduos controle AF sem estas manifestações. O gene *MMP1* tanto o SNP *MMP1* -1607 1G/2G quanto os níveis de expressão foram associados ao risco de AVE, a expressão do *MMP1* também foi associada a maior frequência de CVO/ano. Os níveis de expressão de *MMP7*, *TIMP1* e *TIMP2* estiveram aumentados em pacientes condicionantes a AVE. O SNP 372T>C (rs4898) *TIMP1* alelo T foi mais frequente em pacientes com >5 eventos VOC/ano. O SNP rs17576 do *MMP9* apresentou diferenças nos níveis de expressão do gene, estando aumentados nos genótipos AG, e AG+GG. Os achados desse estudo, os SNPs e expressão gênica dão suporte inicial para um entendimento do papel das MMPs-TIMPs na fisiopatologia da AF em pacientes jovens e as indicando como potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos.

Palavras-chave: Anemia Falciforme; Metaloproteinases da Matriz; Polimorfismo de nucleotídeo único; Acidente Vascular Cerebral.

ABSTRACT

Ó, Kleyton Palmeira do. Evaluation of polymorphisms and gene expression of metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in vaso-occlusive events in young people with sickle cell anemia. 2023. Thesis (Doctorate) - Instituto Aggeu Magalhães, Graduate Program in Biotechnology and Biosciences in Health, Recife, 2023.

Sickle cell anemia (SCA) causes chronic inflammatory manifestations, in which vascular occlusion and hemolysis trigger most of the signs and symptoms present in patients. Molecules such as matrix metalloproteinases (MMPs) and their endogenous tissue inhibitors (TIMPs) that act in the processes of proliferation, differentiation, motility, apoptosis, angiogenesis and adhesion, can influence the regulation of vaso-occlusive events (EVO) and inflammatory in SCA. Thus, genetic polymorphisms (SNPs) in these proteins can modify their expression levels and, when associated with SCA, playing the role of biomarkers. The aim of this study was to evaluate polymorphisms in MMP1 1G/2G genes (rs1799750); MMP2-1306 C/T (rs2285053 and rs243865), MMP9 C/T (rs17576), TIMP1+372 C/T (rs4898) and TIMP2-418 G/C (rs7501477), along with the expression of MMPs and their inhibitors and their relation to EVOs in SCA. The methods for the development of this work included collection of biological samples from 251 patients with SCA for extraction of genomic DNA and mRNA; from genotyping and expression assay by real-time PCR, respectively. Clinical and laboratory data were obtained from the patients' medical records, made available by the Hospital de Hemoterapia de Pernambuco (Hemope). This study was characterized as cross-sectional with comparison groups. The groups were divided according to vaso-occlusive events (VOC), stroke and cerebrovascular disease (CVD), compared to SCA control subjects without these manifestations. The MMP1 gene, both the SNP MMP1 -1607 1G/2G and expression levels were associated with the risk of stroke, MMP1 expression was also associated with a higher frequency of VOC/year. The expression levels of MMP7, TIMP1 and TIMP2 were increased in patients with stroke. The SNP 372T>C (rs4898) TIMP1 T allele was more frequent in patients with >5 VOC events/year. The MMP9 SNP rs17576 showed differences in gene expression levels, being increased in the AG, and AG+GG genotypes. The findings of this study, the SNPs and gene expression provide initial support for an understanding of the role of MMPs-TIMPs in the pathophysiology of SCA in young patients and indicating them as potential biomarkers and therapeutic targets.

Keywords: Sickle cell; Matrix Metalloproteinases; polymorphism, Single Nucleotide; Stroke.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	-	Estrutura da hemoglobina	19
Figura 2	-	Localização e organização cromossômica dos clusters dos genes β -globina (A) e α -globina (B)	20
Figura 3	-	Linha do tempo das principais descobertas e eventos significativos na SCA	22
Figura 4	-	Mutação de ponto do tipo transversão	23
Figura 5	-	Representação esquemática do processo de indução à falcização das hemácias pela polimerização da desoxiemoglobina, diante da baixa concentração de oxigênio	24
Figura 6	-	Processo de vaso-oclusão	27
Figura 7	-	Representação esquemática da estrutura básica de uma metaloproteinase	35
Figura 8	-	Localização e interações entre inibidores de tecido de metaloproteases de matriz (TIMPs) e metaloproteases de matriz (MMPs)	38
Figura 9	-	Posição cromossômica do gene MMP2	39
Figura 10	-	Estrutura da metalopeptidase de matriz 2 (MMP2)	40
Figura 11	-	Localização cromossômica do gene TIMP2	41
Figura 12	-	A via MMP-9	43
Figura 13	-	Localização do gene MMP-9	44
Figura 14	-	Localização do gene TIMP-1	45
Figura 15	-	Heatmap expressão gênica das MMPs-TIMPs em pacientes com anemia falciforme e doença cerebrovascular (figura A) e crise vaso-oclusiva (figura B)	58
Figura 16	-	Expressão gênica MMPs-TIMPs em indivíduos com crise vaso oclusiva (fig A); doença cerebrovascular (fig B)	59
Figura 17	-	Expressão gênica MMPs-TIMPs em indivíduos com histórico de acidente vascular encefálico (figura A) e risco aumentado para ischemic stroke, avaliado pelo DTC (Figura B)	60

Figura 18	-	Expressão gênica MMPs-TIMPs em relação ao uso de HU (figura A) e correlação dos genes MMPs-TIMPs (Figura B)	62
Figura 19	-	Expressão gênica das MMPs-TIMPs em relação aos SNPs	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Características clínicas dos pacientes com AF (genótipo HbSS)	50
Tabela 2	-	Equilíbrio de Hardy-Weiberg na população de estudo	52
Tabela 3	-	Frequência dos SNPs dos genes MMPs-TIMPs nos pacientes com AF e CVO	53
Tabela 4	-	Frequência dos SNPs dos genes MMPs-TIMPs nos pacientes com AF e risco para AVE	54
Tabela 5	-	Frequência dos SNPs dos genes MMPs-TIMPs nos pacientes com AF e CVD	55
Tabela 6	-	Frequência dos SNPs dos genes MMPs-TIMPs nos pacientes com SCA e AVE	56
Tabela 7	-	Fold change do ensaio de expressão, análise por grupo	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AF	Anemia falciforme
ATP	Adenosina trifosfato
AVE	Acidente vascular encefálico
CO ₂	Gás carbônico
DF	Doença falciforme
DTC	Doppler transcraniano
EVO	Eventos vaso oclusivos
Glu	Ácido glutâmico
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HBSS	Homosigossidade para hemoglobina S
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HU	Hidroxiuréia
IL1B	Interleucina 1 beta
IL3	interleucina 3
IL6	Interleucina 6
JRT	Jato de regurgitação tricúspide
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases de matriz
NO	Oxido nítrico
O ₂	Oxigênio
SE	Sequestro esplênico
SEA	Sequestro esplênico agudo
SNPs	polimorfismos de nucleotídeo único
STA	Síndrome torácica aguda
T	Timina

TIMPs	inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz
TNF-a	Fator de necrose tumoral alfa
UMI	Úlcera de membro inferior
Val	Valina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	19
3.1	HEMOGLOBINA	19
3.2	DOENÇA FALCIFORME	21
3.3	ANEMIA FALCIFORME	21
3.3.1	Epidemiologia	24
3.3.2	Fisiopatologia da Anemia Falciforme	26
3.3.3	Vaso-oclusão	27
3.3.4	Hemólise	28
3.3.5	Manifestações agudas na Anemia Falciforme	29
3.3.6	Manifestações crônicas	31
3.3.7	Tratamento	33
3.4	METALOPROTEINASES DA MATRIZ (MMPs) E SEUS INIBIDORES TECIDUAIS (TIMPs)	34
3.4.1	Metaloproteinase de Matriz 2 (MMP- 2) e TIMP-2	38
3.4.2	Metaloproteinase de matriz 9 (MMP- 9) e TIMP-1	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	DESENHO DO ESTUDO	46
4.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO	46
4.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	47
4.4	COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS	47
4.5	SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCS)	47
4.6	EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO (DNA GENÔMICO E mRNA TOTAL)	47
4.7	SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)	48
4.8	DETECÇÃO DAS VARIANTES POLIMÓRFICAS	48
4.9	EXPRESSÃO DOS GENES MMP-2, MMP-9, TIMP-1 E TIMP2 ..	48
4.10	MÉTODOS DE ANÁLISE DE DADOS	49

4.11	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	49
5	RESULTADOS	50
6	DISCUSSÃO	63
6.1	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	APÊNDICE A - ARTIGO DE REVISÃO SUBMETIDO NA REVISTA 'HEMOGLOBIN'	84
	APÊNDICE B - ARTIGO ACEITO NA REVISTA 'MOLECULAR BIOLOGY REPORTS'	102
	APÊNDICE C - PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DURANTE O CURSO	132
	APÊNDICE D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	134
	APÊNDICE E - TERMO DE ASSENTIMENTO	136
	ANEXO A - CARTA DE ACEITE DO ARTIGO ORIGINAL	138
	ANEXO B - PARECER COMITÊ DE ÉTICA	139
	ANEXO C - ATA DE DEFESA	144

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, estima-se que 2 milhões de indivíduos são portadores da hemoglobina S (HbS) em heterozigose, sendo a frequência do gene β S bastante variada e maior nas regiões norte e nordeste (6 a 10%), e menor nas regiões sul e sudeste (2 a 3%). A proporção de nascidos vivos com traço falciforme (HbAS) no estado de Pernambuco é de 1:21 (SILVA, 2012; PIEL *et al.*, 2013).

AF é uma doença genética, causada por uma mutação pontual, substituindo uma base nitrogenada adenina (A) para timina (T) ($GAG \rightarrow GTG$), resultando na troca do ácido glutâmico (Glu) pela valina (Val) na posição 6 da cadeia β -globina. Assim, a hemoglobina A (HbA) é substituída pela Hb da AF (HbS). Desta troca, resulta a polimerização da Hb, em baixas tensões de oxigênio, o que torna o eritrócito rígido e em forma de foice, diminuindo sua flexibilidade e, assim, dificultando sua passagem através da microcirculação (FERRAZ *et al.*, 2007; SIMOES *et al.*, 2010).

AF caracteriza-se por manifestações inflamatórias crônicas, decorrentes de diversos fatores, como: 1) alterações do metabolismo de óxido nítrico; 2) fenômenos inflamatórios crônicos; 3) adesão de eritrócitos, ao endotélio vascular, provocando oclusão vascular (ZAGO *et al.*, 2007).

A ocorrência de oclusões vasculares determina a maioria dos sinais e sintomas presentes no quadro clínico dos pacientes, tais como crises hemolíticas, úlceras de membros inferiores, crises algicas, dactilite (síndrome mão-pé), síndrome torácica aguda (STA), sequestro esplênico agudo (SEA), retinopatia, insuficiência renal crônica, auto esplenectomia, acidente vascular encefálico (AVE), problemas cognitivos, priapismo e infecções, ambos caracterizados como eventos vaso oclusivos (EVO) (DU *et al.*, 2015)

Moléculas que controlam funções celulares básicas, tais como as metaloproteinases de matriz (MMPs), que atuam nos processos de proliferação, diferenciação, motilidade, apoptose, angiogênese e adesão, podem vir a exercer influência na regulação dos EVO e inflamatórios nos pacientes com AF (MUNHOZ, 2014).

A atividade das MMPs é regulada por citocinas, hormônios, fatores de crescimento, estresse oxidativo e interação das MMPs com seus inibidores teciduais endógenos, os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs). Em condições fisiológicas,

existe um equilíbrio entre a razão de MMPs e TIMPs. Entretanto, em algumas doenças, como a hipertensão arterial, aterosclerose e acidente vascular encefálico, ocorre um desequilíbrio dessa razão, resultando na degradação excessiva das proteínas da ECM e, conseqüentemente, ao remodelamento vascular patológico (GAO *et al.*, 2019; HSU *et al.*, 2019).

Assim, a presença de polimorfismos nos genes *MMPs* poderiam estar relacionados com os níveis de expressão destes genes, além de estarem associados com a predisposição genética a várias doenças. Alguns SNPs (*single nucleotide polymorphism*) têm sido identificados nos genes *MMP-2*: -735 C/T (rs2285053), -1306 C/T (rs243864) e -1575 G/A (rs243866) e *MMP-9*: C/T (rs17576) e em seus inibidores *TIMP-1* +372 C/T (rs4898) e *TIMP-2* -418 G/C, (rs7501477).

Desse modo, os polimorfismos em genes que codificam proteínas envolvidas em processos biológicos, tais como: adesão, proliferação e diferenciação celular, apoptose e inflamação, frequentes nos EVO na AF, podem ser utilizados como biomarcadores identificando precocemente os EVO, auxiliando os profissionais de saúde no melhor manejo clínico desses pacientes e, conseqüentemente, evitando possíveis complicações decorrentes desses processos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência dos genes das metaloproteinases (*MMPs*) e seus inibidores (*TIMPs*) nos eventos vaso-oclusivos (EVO) em jovens com anemia falciforme (AF) atendidos no centro de hematologia e hemoterapia de Pernambuco - hemope.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a existência de associação entre as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos dos genes *MMP1* 1G/2G, *MMP2* -1306 C/T, *MMP9* -1562 C/T, *TIMP1* +372 C/Te *TIMP2* -418 G/C com a frequência de EVO em pacientes com AF;
- Verificar a existência de associação entre a expressão dos genes *MMP1*, *MMP2*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2* com a frequência de EVO em pacientes com AF;
- Verificar a existência de associação entre os polimorfismos e expressões dos genes *MMP1*, *MMP2*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2* em pacientes com AF;
- Avaliar a correlação entre a expressão dos genes *TIMPs* e a expressão dos genes *MMPs* em pacientes com AF;

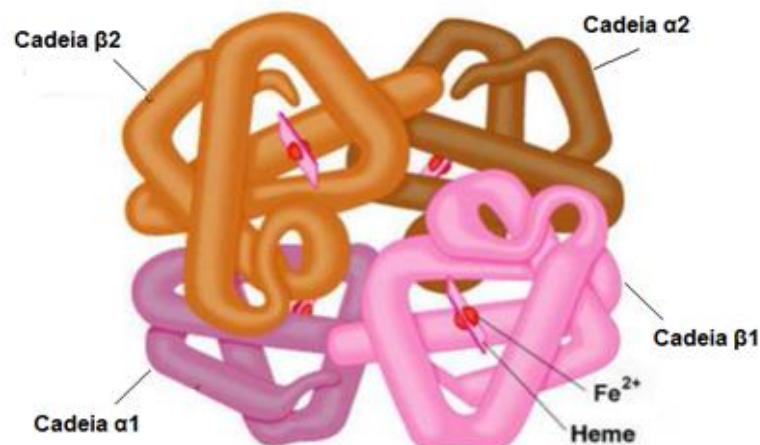
3 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

3.1 HEMOGLOBINA

O oxigênio (O_2) é essencial na geração de energia para as células metabolicamente ativas do corpo (RHODES; VARACALLO, 2020). O O_2 é transportado pela Hemoglobina (Hb), uma proteína que se encontra no interior dos eritrócitos, cuja função é transportar O_2 dos pulmões para todo o organismo e remover o gás carbônico (CO_2) dos tecidos para o pulmão. Esse transporte é baseado na capacidade dos seus átomos de ferro se combinarem reversivelmente com O_2 e ao movimento de suas subunidades (HOLOSBACK *et al.*, 2010; MARQUES *et al.*, 2012).

A estrutura quaternária e tridimensional da molécula de Hb A Hb é formada por dois pares de cadeias polipeptídicas. Sendo as cadeias alfa (α) formadas por 141 aminoácidos e as cadeias tipo não- alfa (beta β , delta δ , gama γ e épsilon ϵ) com 146 aminoácidos (**Figura 1**). Estas cadeias formam um arranjo helicoidal que origina uma molécula globular e funcional (HOLOSBACK *et al.*, 2010; FRENETE *et al.*, 2007).

Figura 1 – Estrutura da hemoglobina.

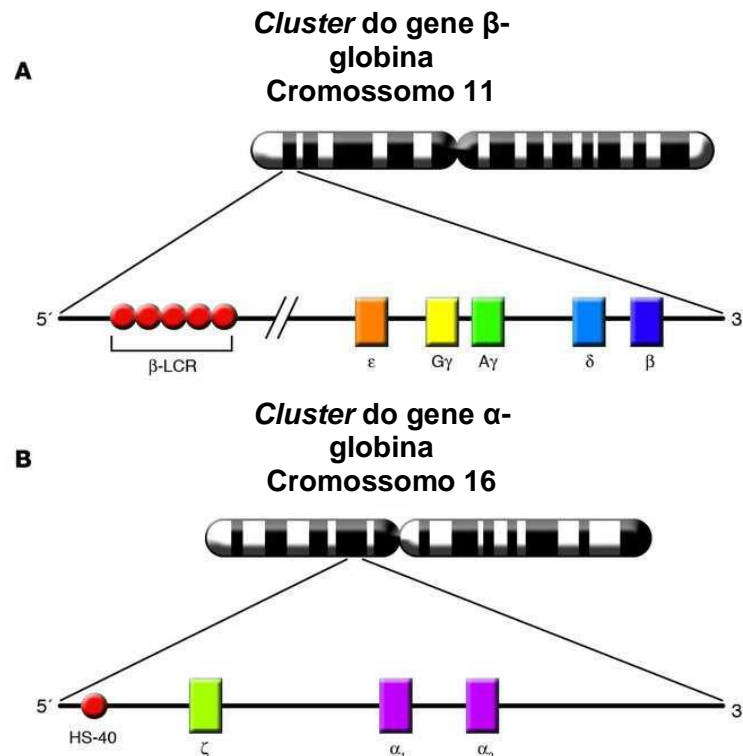


Fonte: Adaptado de MARQUES *et al.* (2012)

Os cromossomos 11 e 16 são responsáveis pela síntese das cadeias dos variados tipos de Hb, sendo que a síntese do *cluster* α (ζ , $\alpha 1$ e $\alpha 2$) ocorre no braço curto do cromossomo 16 (16p), e do *cluster* β (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ e β) no braço curto do cromossomo 11 (11p) (**Figura 2**) (FRENETE *et al.*, 2007). As diferentes combinações entre as cadeias globínicas possibilitam o surgimento de Hb distintas presentes nos eritrócitos, desde o período embrionário até a fase adulta e, para que o

tetrâmero funcional seja formado, é necessário um perfeito equilíbrio e integridade gênica na produção destas cadeias (NET *et al.*, 2003).

Figura 2 – Localização e organização cromossômica dos clusters dos genes β -globina (A) e α -globina (B).



Fonte: Adaptado de Frenette *et al.* (2007).

As alterações que venham a comprometer as funções e estrutura da Hb são chamadas de hemoglobinopatias. A maior parte delas é proveniente de alterações genéticas nas cadeias que compõem a molécula de Hb, e estas são incluídas entre as doenças genéticas mais prevalentes no mundo e que apresentam altas taxas de mortalidade (HOLOSBAACH *et al.*, 2010; SABATH *et al.*, 2017).

As alterações que ocorrem na síntese são denominadas de talassemias, e caracterizam-se pela síntese reduzida ou nula de um ou mais dos tipos de cadeias globínicas. Já as alterações estruturais incluem a substituição, deleção e inserção de um ou mais aminoácidos, como também a fusão de duas cadeias globínicas diferentes, causando a formação de uma Hb anormal. Dentre as estruturais, as mais importantes é a HbS ($\alpha_2\beta_2^6$ GLU \rightarrow VAL), conhecida pela gravidade, frequência e mortalidade (BUNN, 1997; NETO *et al.*, 2003).

3.2 DOENÇA FALCIFORME

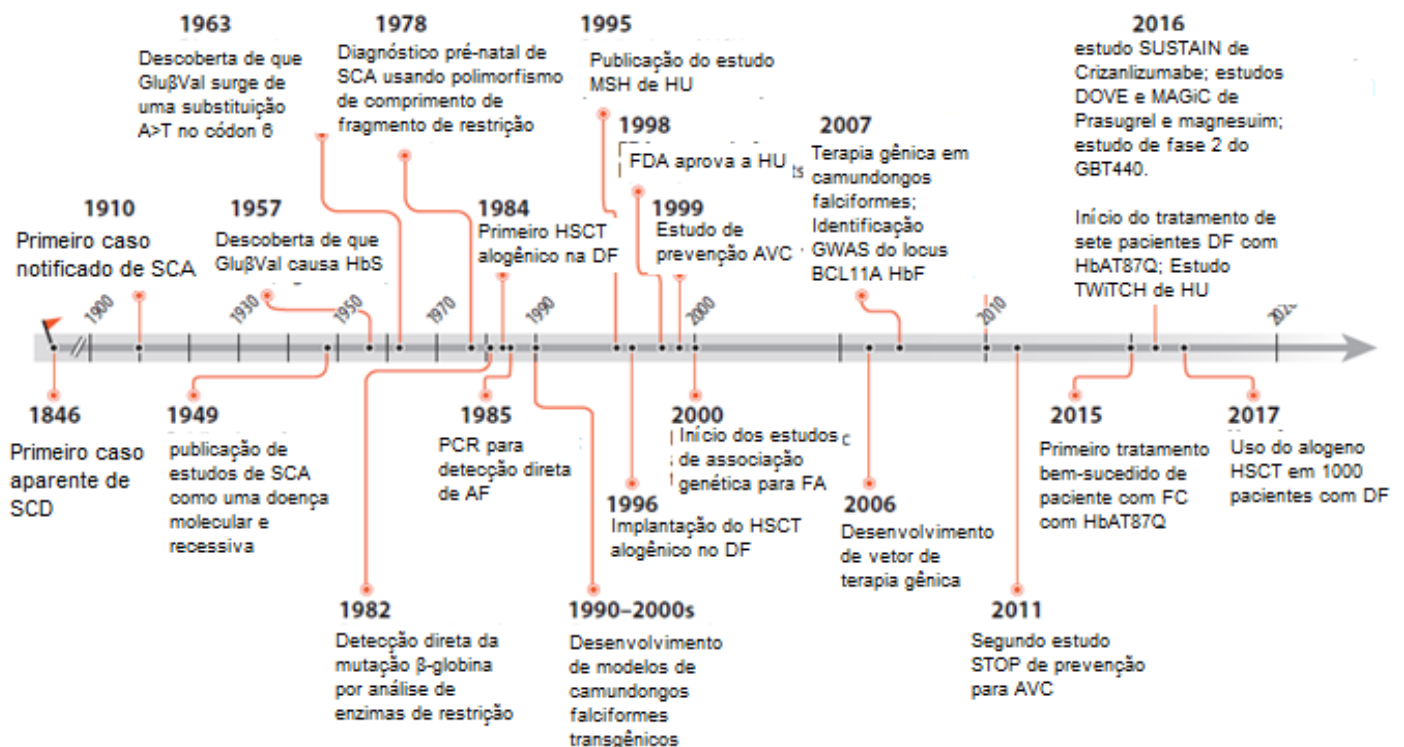
O termo doença falciforme (DF) descreve uma síndrome clínica e genética causada pela presença de HbS que, associada a outras variantes anormais da Hb, geram quadros clínicos semelhantes e são tratadas da mesma forma. As principais formas incluem a homozigiosidade para a mutação rs334 (HbSS), conhecida como AF, e heterozigiosidade entre rs334 (HbS) e mutações que resultam em outras variantes estruturais de β -globina, como HbC ($\alpha_2\beta_2^{6\text{GLU}\rightarrow\text{LYS}}$), ambas variantes de cadeias β , ou níveis reduzidos de β -globina (β -talassemia). A DF caracteriza-se como um problema de saúde pública, principalmente nos países que sofreram forte influência do tráfico de escravos, como o Brasil, sendo a AF a mais descrita na literatura e foco desta revisão, devido à alta taxa de morbidade e mortalidade. Em pacientes de origem africana, a AF é a causa mais comum de DF (65–70%), seguida pela HbSC (cerca de 30%) e HbS/ β -talassemia (WILLIAMS; THEIN SL, 2018; BUNN, 1997; ESTCOURT *et al.*, 2017; FERRAZ *et al.*, 2007; MS-SCD, 2006; CANÇADO, 2007; SIMOES *et al.*, 2010).

3.3 ANEMIA FALCIFORME

Em termos de histórico, a AF foi primeiramente descrita por Herrick (1910), quando relatou corpúsculos vermelhos bem característicos, alongados e em forma de foice, como descrito na microscopia eletrônica. Só em 1949, Pauling *et al.*, (1949) atribuiu sua origem como “doença molecular”, com a presença de uma hemoglobina mutada (HbS) no eritrócito, em substituição a hemoglobina normal (HbA) (NETO *et al.*, 2003; AZEVEDO, 1973). Alguns anos depois, Ingram (1957) determinou que a HbS era causada por uma mutação de provocava uma única substituição de aminoácido na cadeia β -globina da molécula da hemoglobina. Só em 1963, com o avanço das técnicas de biologia molecular e análise gênica, Goldstein *et al.*, (1963) destacaram que essa substituição de aminoácido surgiu a partir de uma única mudança de base (A>T) no códon 6 (rs334). Por ser uma doença proveniente de uma única mutação em um único nucleotídeo, a AF tem sido um dos maiores exemplos que contribuem para o entendimento dos efeitos de background genético, ou seja, a influência de outros genes na heterogeneidade clínica da doença e alvo de estudos de associação genômica (SAIKI *et al.*, 1985; SCHECHTER, 2008; UDA *et al.*, 2008).

Associações envolvendo a hemoglobina fetal (HbF) correspondem aos os estudos mais abordados para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e influência na gravidade da AF (MENZEL *et al.*, 2007; HOBAN *et al.*, 2016). Williams; Thein, (2018) criaram uma cronologia bastante interessante com as principais descobertas genéticas e eventos significativos na história da AF (**Figura 3**).

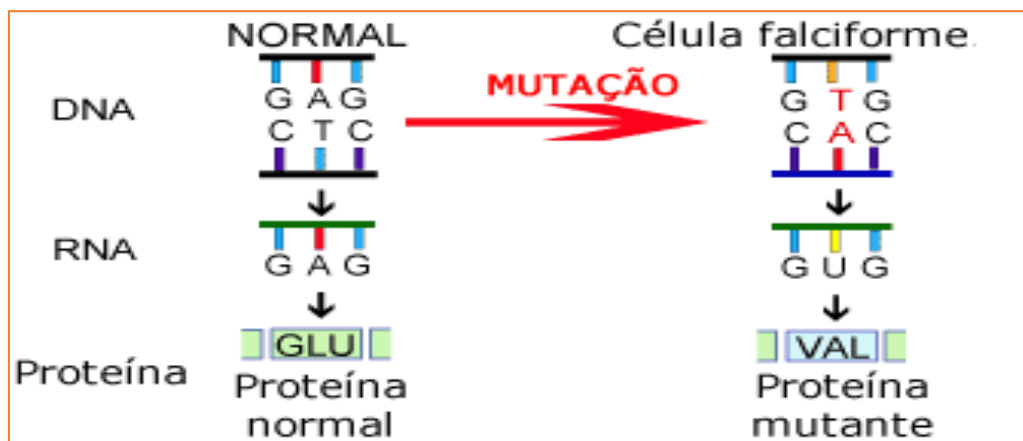
Figura 3. Linha do tempo das principais descobertas e eventos significativos na SCA. Abreviaturas: DOVE, Determinação dos efeitos da inibição plaquetária em eventos vaso-oclusivos; FDA, US Food and Drug Administration; Glu β 6Val, substituição de valina por ácido glutâmico na posição 6 da cadeia β -globina da hemoglobina; GWAS, estudo de associação do genoma; HbA/F/ S, hemoglobina A/F/S; HSCT, transplante de células-tronco hematopoéticas; MAGiC, Magnésio para Crianças em Crise; MSH, Estudo multicêntrico de hidroxiureia na anemia falciforme; SCA, anemia falciforme; SCD, doença falciforme; STOP, ensaio de prevenção de derrame na anemia falciforme; SUSTAIN, Estudo para avaliar a segurança e o impacto de SelG1 com ou sem terapia com hidroxiureia em pacientes com doença falciforme com crises de dor; TWiTCH, Doppler transcraniano com transfusões mudando para hidroxiureia.



Fonte: Williams; Thein, (2018, tradução nossa).

AF é uma doença genética, causada por uma anormalidade na Hb, presente nos eritrócitos, onde ocorre uma substituição de uma base nitrogenada adenina (A) para timina (T) (GAG → GTG), resultando na troca do aminoácido ácido glutâmico (Glu) por valina (Val) na posição 6 da cadeia β-globina (**Figura 4**) (FERRAZ *et al.*, 2007; MS-SCD, 2006; CANÇADO, 2007; SIMOES *et al.*, 2010). A Val, por ser um aminoácido neutro, permite a aproximação de outras moléculas de HbS, e forma um bolso hidrofóbico na cadeia beta da HbS, que interage com a subunidade hidrofóbica da outra molécula de HbS vizinha, o que, por sua vez, favorece a formação dos polímeros, que irão precipitar no interior do eritrócito. Isso não é possível na presença do Glu que, por ser carregado negativamente, não permite a formação dos polímeros. E, a membrana do eritrócito, é o principal espelho, onde se refletem as alterações que estão ocorrendo no seu interior (MARQUES *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2005; NAOUM, 2000).

Figura 4 – Mutação de ponto do tipo transversão, em que há a troca de uma base purínica (adenina - A) por uma pirimídica (timina - T) (GAG→GTG), na posição 6 da cadeia β globina. Esta alteração faz com que seja codificado a hemoglobina S, em substituição da hemoglobina A.

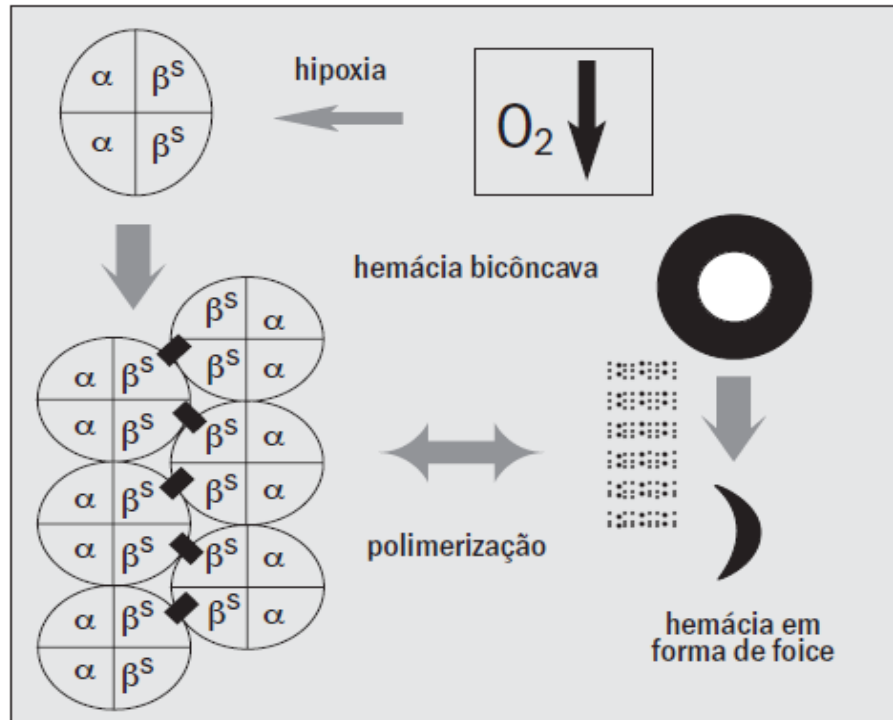


Fonte: IB.USP.br, <http://ecologia.ib.usp.br/evosite/evo101/IIIC2aCasestudy.shtml>,

acesso em 15 de abril de 2019.

Quando os níveis de O₂ reduzem na circulação e as moléculas de Hb não estão ligadas ao O₂, ocorre a polimerização da Hb em longas fibras, formando uma espécie de gel, que torna o eritrócito rígido e em forma de foice, diminuindo sua flexibilidade e, conseqüentemente, dificultando sua passagem através dos vasos, principalmente nos de menor calibre (**Figura 5**) (JORGENSEN *et al.*, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2014; SANTOS-SILVA *et al.*, 2005).

Figura 5 - Representação esquemática do processo de indução à falcização das hemácias pela polimerização da desoxiemoglobina, diante da baixa concentração de oxigênio.



Fonte: Adaptado de Neto *et al.* (2003).

A falcização dos eritrócitos pode ser um processo reversível, com a reoxigenação da Hb, desde que sua membrana não seja permanentemente alterada. Quando isto ocorre, formam-se os eritrócitos irreversivelmente falcizados, que permanecem alterados independentemente do estado da HbS intracelular (MS, 2002; LUCARELL *et al.*, 2012). A polimerização dos eritrócitos desoxi-HbS depende de numerosas variáveis, tais como: pH; concentração de oxigênio; concentração de HbS; temperatura; pressão; força iônica; presença de Hb normais e alterações na membrana celular do eritrócito (HIRUMA *et al.*, 1995).

3.3.1 Epidemiologia

A teoria que responde acerca do surgimento da AF provém de mecanismos ainda não completamente elucidados, em que os heterozigotos apresentam uma vantagem de sobrevivência em ambientes endêmicos para malária (WILLIAMS; THEIN, 2018). No estudo, *Malar. Genom. Epidemiol. Netw.* (2014), foi destaque que 12.000 casos graves de malária e mais de 17.000 controles estão distribuídos na

África, Ásia e Oceania, e atribuiu cerca de 86% de redução do risco de malária grave ao genótipo heterozigoto HbAS. Isso beneficiou um processo de seleção desse genótipo nessas populações endêmicas de malária, que se difundiu para outras populações no mundo, definida em 5 haplótipos: Senegal, Benin, República Centro-Africana/Bantu, Camarões e haplótipos árabe-indianos (FLINT, 1998).

Autores sugerem que mais de 300.000 crianças nascem com AF no mundo a cada ano (HASSELL, 2010; PIEL *et al.* 2013). A maior prevalência da HbS ocorre na África. No Brasil, estima-se que cerca de dois milhões de indivíduos são portadores da HbS em heterozigose, sendo a frequência do gene que codifica a HbS bastante variada, maior nas regiões Norte e Nordeste (6 a 10%), e menor nas regiões sul e sudeste (2 a 3%). No Brasil, nascem cerca de 200.000 HbAS. Nos estados que concentram a maior parte da população negra do país, tais como a Bahia, Pernambuco, Rio de Janeiro e Minas Gerais, a partir de dados da triagem neonatal indicam as mais altas incidências de AF (DIAS, 2005; MARTINS *et al.*, 2010). A proporção de nascidos vivos HbAS no estado de Pernambuco é de 1:23 (LOUREIRO *et al.*, 2005; FELIX *et al.*, 2010; SILVA, 2012).

A metodologia para o diagnóstico da AF, em geral, pode ser realizada por meio de: hemograma completo; eletroforese alcalina em acetato de celulose; eletroforese ácida em ágar ou agarose; cromatografia líquida de alta performance (HPLC), teste de solubilidade e dosagem de HbF (MINISTÉRIO DA SAÚDE- BRASIL, 2002). A qualidade de vida e a sobrevivência dos pacientes se iniciam com o diagnóstico, aliado ao uso da penicilina profilática, educação e cuidados familiares (BRAGA 2007).

A hidroxiuréia (HU) é a droga amplamente utilizada como alternativa para o tratamento da AF, pois atua induzindo o aumento de HbF, diminuindo a expressão de moléculas de adesão da superfície eritrocitária e plaquetária e de proteínas receptoras no endotélio. Assim, diminui a gravidade da doença; entretanto, altas doses ou tratamento prolongado com HU pode resultar no desenvolvimento de leucemia aguda. Novas drogas têm sido estudadas para o estímulo da produção de HbF (JESTE *et al.*, 2017; KHAYAT *et al.*, 2004). Pois elevados níveis de HbF diminuem a falcização e a hemólise, bem como a co-hereditariedade junto à α -talassemia estão associadas a uma anemia menos profunda, boa função esplênica e favorece na proteção contra o acidente vascular encefálico (AVE) (ADEKILE *et al.*, 2005).

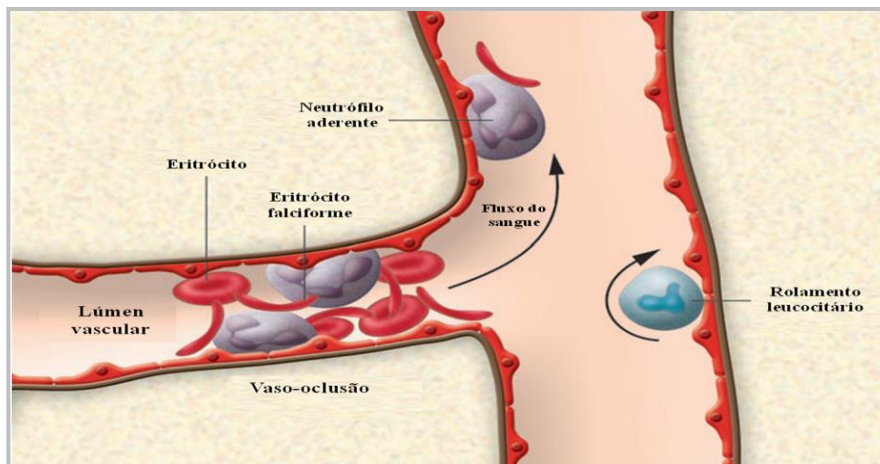
3.3.2 Fisiopatologia da Anemia Falciforme

A clínica da AF é extremamente variável e as razões para estas heterogeneidades não são completamente entendidas, variando de formas quase assintomáticas até formas clinicamente graves, responsáveis por alta mortalidade, principalmente durante a infância (SERJEANT, 1997; HIGGS *et al.*, 2008).

Como já descrito no início desta revisão, a polimerização da HbS é o primeiro fator que está relacionada às consequências fisiopatológicas da AF, que ocorre em condições de baixa tensão de oxigênio. Nessas condições, os eritrócitos passam por alterações tanto estruturais quanto funcionais, que causam consequências danosas em diversos órgãos e tecidos do corpo (BUNN, 1997; ZHANG, *et al.*, 2016). Além disso, admite-se que vários fatores podem influenciar no fenótipo da AF, dentre estes, são exemplos os fatores genéticos, ambientais, condições socioeconômicas e acesso à assistência médica (NETO, *et al.*, 2003; SANTOS-SILVA *et al.*, 2005; ZAGO *et al.*, 2007).

As manifestações inflamatórias crônicas são características presentes na AF, que decorrem de diversos fatores que se interligam e se retroalimentam, gerando um ciclo inflamatório permanente, cujo surgimento está relacionado a três mecanismos inter-relacionados: **1)** a adesão de eritrócitos, granulócitos, monócitos e plaquetas ao endotélio vascular, ocasionando oclusão-vascular (**Figura 6**); **2)** fenômenos inflamatórios crônicos e ocorrência de hemólise, exacerbados por episódios agudos e produção de intermediários inflamatórios, como citocinas; **3)** alterações do metabolismo de óxido nítrico e estresse oxidativo (NO) (ZAGO *et al.*, 2007).

Figura 6 – Processo de vaso-oclusão.



Fonte: Adaptado de FRENETTE; ATWEH, (2012).

3.3.3 Vaso-oclusão

O processo de formação de polímeros no interior dos eritrócitos e de falcização pode ser reversível com a reoxigenação, porém, a falta de oxigênio ligado a Hb por períodos prolongados pode gerar um efeito permanente na célula (STEINBERG *et al.* 2009). Eritrócitos modificados tem grande dificuldade de passagem pela microcirculação, vasos de menor calibre, devido tanto ao formato do eritrócito quanto pela redução da sua flexibilidade e rigidez da membrana. Isso resulta no aprisionamento dos eritrócitos no endotélio do vaso, causando uma possível obstrução que leva a diversos outros processos, principalmente a ativação da inflamação (DU *et al.*, 2015).

Na AF, também ocorrem alterações no endotélio, com aumento da expressão de proteínas envolvidas no processo de adesão celular (VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, P-selectina, laminina, tromboplastina, fibronectina e integrina $\alpha V\beta 3$). Estas proteínas interagem com moléculas de adesão presentes nos eritrócitos falcizados e leucócitos, promovendo a vaso-oclusão e estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias (incluindo TNF, IL-6, IL1- β e IL-3) (TURHAN *et al.*, 2002; HIDALGO *et al.*, 2009). O endotélio ativado promove o recrutamento de leucócitos, que interagem com os eritrócitos, cujos eritrócitos podem ficar presos nos vasos de menor calibre, propiciando desoxigenação e falcização e, posteriormente, vaso-oclusão (FRENETTE; ATWEH, 2012). Segundo Naoum (2000), os eritrócitos falciformes, em nível circulatório, apresentam aspecto rígido desencadeado pela polimerização da

HbS, onde apresentam maior chance de se aderirem ao endotélio vascular. Tal aderência ocorre devido a interação dos eritrócitos com as células endoteliais, com participação dos antígenos de superfície celular (CD36 e CD44) e outras moléculas, fato que evolui para mais moléculas de HbS no estado desoxigenado e, conseqüentemente, aumenta a obstrução vascular.

Além dos leucócitos, as plaquetas também estão envolvidas no processo de vaso-oclusão na AF, e sua ativação é aumentada durante a obstrução, formando um agregado com eritrócitos, monócitos e neutrófilos, gerando um estado de hipercoagulabilidade, que pode levar a eventos trombóticos venosos e arteriais, podendo causar embolia pulmonar (VILLAGRA *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2016). A prática clínica de muitos centros de saúde inclui terapias anticoagulativas de forma profilática nos pacientes com AF, pois pacientes com oclusões vasculares recorrentes são mais propensos a desenvolverem eventos adicionais decorrentes, assim, é recomendável que os pacientes façam uso de anticoagulantes ao longo da vida (WILLIAMS *et al.*, 2018).

3.3.4 Hemólise

A vida útil de um eritrócito falcizado é de cerca de 16 dias, em comparação com 120 dos eritrócitos normais (HEBBEL, 2011).

A membrana dos eritrócitos HbSS desoxigenados é constantemente exposta a danos mecânicos que causam a sua ruptura e originam um estado de anemia hemolítica crônica. Isto acarreta em uma disfunção endotelial, proliferação vascular, estresse oxidativo e inflamatório. Os eritrócitos falcizados sofrem alteração na distribuição da membrana fosfolipídica, após desoxigenação, aumentando a exposição de fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina na parte externa, as quais têm sido relacionadas com o aumento da aderência às células endoteliais, da atividade pró-coagulante e da aderência às células mononucleares fagocíticas. Dentre outras alterações da membrana, têm-se o rearranjo das proteínas espectrina-actina, diminuição de glicoproteínas de superfície, geração de radicais livres e aceleração da apoptose (MACHADO, 2007; MANFREDINI, 2007).

Além disso, já foi observado em camundongos que a exposição das células endoteliais ao grupo heme induz a produção de algumas moléculas de adesão, como ICAM-1, P-selectina e fibronectina, também ao recrutamento de neutrófilos e aumento

da permeabilidade vascular, o que pode exacerbar o processo de vaso-oclusão. Como consequência, foi proposto que a variação no grau de hemólise nos pacientes pode contribuir para heterogeneidade fenotípica na AF (WAGENER *et al.*, 2001; KATO *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2014).

A AF apresenta períodos assintomáticos intercalados com períodos de intensa sintomatologia, que envolvem diversos órgãos. As manifestações clínicas, geralmente, ocorrem quando os níveis de HbF no sangue reduzem a valores inferiores a 30%, isto acontece por volta do sexto mês de vida (LOUREIRO, 2005). Na segunda década de vida, aumentam as chances do aparecimento de complicações em órgãos, como rins, pulmões e olhos, devido à ocorrência de vaso-oclusões, que juntamente com isquemia-reperfusão, ativação do endotélio vascular e hemólise, determinam a maioria dos sinais e sintomas presentes no quadro clínico dos pacientes, tais como: crises hemolíticas, crises álgicas, dactilite (síndrome mão-pé), síndrome torácica aguda (STA), sequestro esplênico agudo (SEA), retinopatia, insuficiência renal crônica, esplenectomia, AVE, problemas cognitivos, priapismo, infecções (principalmente por bactérias), episódios dolorosos provocados por obstrução vascular e o surgimento úlceras de membros inferiores, afetando geralmente pacientes acima dos 18 anos (MARQUES *et al.*, 2012; KOSARAJU *et al.*, 2017; JOHNSON *et al.*, 2008; CHACHAL *et al.*, 2001).

3.3.5 Manifestações agudas na Anemia Falciforme

A dactilite ou síndrome mão-pé é uma das manifestações clínicas mais comuns em crianças com AF, caracterizada pelo inchaço doloroso das extremidades, causada pelo infarto da medula dos pequenos ossos das mãos e pés (YAWN *et al.*, 2014). É uma complicação decorrente do processo de vaso-oclusão agudo, causando dor e edema no dorso das mãos e/ou pés, que pode ser acompanhado por aumento da temperatura local e eritema. A dactilite pode durar de uma a duas semanas, apresentar recorrência, mas raramente causa sequelas permanentes (DA SILVA JUNIOR *et al.*, 2012).

Já no primeiro ano de vida, devido aos episódios vaso-oclusivos com lesões de isquemia-reperfusão, a complicação aguda mais frequente é a crise dolorosa que afeta principalmente as extremidades, tórax, abdômen e costas. As crises dolorosas podem ser ainda mais agravadas se associadas à necrose óssea ou infecções

secundárias, incluindo osteomielite e artrite séptica. Este evento se inicia por volta do 6 mês de vida, quando os níveis de HbF começam a reduzir nos indivíduos. O tratamento com analgésicos fortes tem sido amplamente utilizado durante as crises dolorosas (WILLIAMS *et al.*, 2018).

A síndrome torácica aguda (STA) é outro evento bastante recorrente em pacientes com AF, as características desse evento são: tosse, falta de ar e sinais de hipoxemia, sendo este um evento difícil de se distinguir de uma pneumonia aguda (GILL *et al.* 1995). A STA é resultante de vários eventos vaso-oclusivos na vasculatura pulmonar dos pacientes, sendo uma das causas mais comuns de morte na AF (FRIEND; GIRZADAS, 2020; DIA *et al.*, 2018).

A medula óssea ou os êmbolos de gordura causam a maioria dos casos de STA em adultos, como observado em lavado broncoalveolar de pacientes que morreram com AF. Isso pode ser decorrente da isquemia e necrose da medula óssea pela vaso-oclusão, que pode liberar medula óssea e gordura para a circulação venosa, que podem chegar aos pulmões causando a STA. Outras causas de STA incluem infecção, asma, hipoxemia, sedação excessiva e complicações pós-operatórias. Os pacientes com DF e asma têm 2-4 vezes mais chances de desenvolver STA que pacientes apenas com AF (DA CUNHA GOMES *et al.*, 2019; COLLA *et al.*, 2018).

Mais comum em crianças abaixo dos 5 anos, o baço é propenso a complicações decorrentes da queda nos níveis da hemoglobina. O sequestro esplênico (SE) ocorre quando as células falciformes ficam aprisionadas na polpa vermelha do baço. Devido ao processo de vaso-oclusão, tal medida causa hipoxia e, em consequência, aumenta a falcização e obstrução do fluxo, provocando aumento do baço. Aliado a isso, infecções bacterianas e inflamação podem agravar este evento. Este evento pode ser autolimitado, mas autoesplenectomia pode ocorrer nesses pacientes ou a remoção cirúrgica do baço pode ser realizada para reduzir as dores agudas decorrentes, porém, a remoção pode aumentar o risco de sepse por bactérias encapsuladas. Assim, nesses pacientes, a vacinação profilática contra pneumonia é amplamente utilizada. Além disso, o SE pode provocar uma anemia hemolítica grave e colapso cardiovascular (BROUSSE *et al.*, 2014; KANE; NAGALLI, 2020; LADU *et al.*, 2020).

Além da forma aguda, outros eventos como priapismo, lesões renais e não menos importante, o AVE também acometem estes indivíduos. O priapismo é caracterizado por uma ereção indesejada e dolorosa do pênis que pode durar mais de 2 horas, podendo ser um evento recorrente ao longo da vida (IDRIS *et al.*, 2020;

WILLIAMS *et al.*, 2018). Já o AVE que, em tese, é o evento mais grave e com uma maior chance de causar morbidade e mortalidade na AF. O AVE na AF em geral ocorre devido a complicações da vaso-oclusão, podendo ocorrer de forma isquêmica ou hemorrágica, sendo o isquêmico o mais frequente. O risco para desenvolver este evento pode ser medido por ultrassonografia transcraniana Doppler, a qual mede a velocidade do fluxo sanguíneo, onde velocidade ≥ 200 cm/s é considerada de alto risco de desenvolver AVE e, assim, o paciente é direcionado para terapia transfusional preventiva (ESTCOURT *et al.*, 2020; WILLIAMS *et al.*, 2018).

3.3.6 Manifestações crônicas

O avanço da medicina preventiva e das práticas clínicas, possibilita uma melhor sobrevivência dos pacientes com AF. Contudo, estes pacientes estão submetidos a complicações crônicas que se dão mais uma vez em face das oclusões vasculares, hemólise e isquemia. A AF é considerada uma doença inflamatória e crônica, devido ao constante estímulo e ativação da resposta imune do indivíduo. A partir de estudos com ressonância magnética, danos neurológicos foram observados como sendo relativamente comuns, provenientes de infartos cerebrais silenciosos (BERNAUDIN *et al.*, 2011).

Coração e pulmão também são órgãos bastante afetado pelos efeitos crônicos da AF, principalmente em crianças mais velhas e adultos. A função pulmonar prejudicada, intolerância a exercícios e insuficiência cardíaca são presentes nesses pacientes (GORDEUK *et al.*, 2016). A hipertensão pulmonar é caracterizada pela elevação da pressão arterial pulmonar e da resistência vascular pulmonar. Cerca de 20 a 30% dos pacientes com AF apresentam essas elevações na pressão pulmonar arterial sistólica, com velocidade do jato de regurgitação tricúspide (JRT) $\geq 2,5$ m/seg, e 8 a 10% dos pacientes apresentam JRT $\geq 3,0$ m/seg (ROBERTO, 2015). A anemia hemolítica gera a liberação de hemoglobina livre no plasma, consome o óxido nítrico (NO), promovendo resistência aos efeitos vasodilatadores dependentes de NO. Além disso, a hemólise causa aumento da expressão celular de endotelina, geração de radicais livres, ativação plaquetária e aumento da expressão de moléculas mediadoras de adesão endotelial (KATO *et al.*, 2005; ROTHER *et al.*, 2005; ROBERTO, 2015).

Complicações renais também podem ocorrer na AF. A hipoxia, acidose e hiperosmolaridade dentro da medula interna do córtex renal propiciam a polimerização da HbS e todos os outros problemas decorrentes da polimerização, que evolui para a doença microvascular crônica, nefropatia falciforme e insuficiência renal, que pode ocorrer desde o início da vida e permanecer na vida adulta (WILLIAMS *et al.*, 2018; WARE *et al.*, 2010).

A úlcera de membro inferior (UMI) é uma complicação que acomete de 8-10% dos pacientes com AF, podendo atingir cerca de 50% dos que residem em áreas tropicais e é predominante no sexo masculino, acima dos 10 anos de idade. A UMI é um evento clínico que pode incapacitar o paciente, associado a pequenos traumas, que vão desde picadas de insetos a cortes e arranhões, também, podendo aparecer sem causa identificada (ARAGÃO, 2015; PALADINO, 2007; STEINBERG, 2008; BAZUAYE *et al.*, 2010). Esta complicação ocorre devido a vaso-oclusão, hipóxia tecidual, hemólise e fatores genéticos, apresenta cicatrização lenta e alta taxa de recorrência. Durante o processo de vaso-oclusão, ocorre a liberação de mediadores da inflamação capazes de promover a adesão de eritrócitos, dentre outras células ao endotélio, diminuindo, assim, o fluxo de sangue e provocando o dano tecidual. Sugere-se que proteínas e moléculas que estão envolvidas na modulação da inflamação estejam também envolvidas no surgimento das UMIs (STEINBERG, 2008; MINNITL, *et al.*, 2010; LEFFLER *et al.*, 2004).

Bazuaye *et al.* (2010), avaliando 250 pacientes com AF, com proporções iguais de homens e mulheres, observaram que 58 pacientes (23,2%) apresentavam história de UMIs. Além disso, foi observado que a úlcera era mais frequente nos homens (3:1) e, ainda, que a idade variou entre 18 e 25 anos. Também, foi observado que o tornozelo esquerdo foi o local mais atingido (66,7%), com lesões de 5-10 cm de diâmetro, com início da úlcera associado a trauma na maioria dos casos, recidiva de 75% e infecção secundária em mais de 80%.

Muitos fatores podem influenciar na gravidade da AF, como exemplo, fatores ambientais, fisiológicos, socioeconômicos e genéticos. Alguns pacientes têm AF associada a α -talassemia (causada pela variante deletional 3.7-kb ($-\alpha$ 3.7) (RODRIGUES *et al.*, 2016). Essa associação reduz a HbS intracelular e, conseqüentemente, a frequência de polimerização e o número de células irreversivelmente falcizadas, além de aumento no hematócrito (STEINBERG; EMBURY, 1986). Isso pode reduzir as complicações hemolíticas, como hipertensão

pulmonar, cardiomiopatia, nefropatia, priapismo e úlceras de membro inferior, porém já foi visto aumento do risco de vaso-oclusão, crises dolorosas, osteonecrose e retinopatia (STEINBERG; ADEWOYE, 2006).

A HbF é uma das moléculas mais estudadas como alvo terapêutico para a AF, cujo aumento deste tipo de Hb reduz os níveis e a polimerização da HbS, por não se ligar a ela no interior do eritrócito. Assim, a HbF pode reduzir as crises dolorosas e aumentar a sobrevida dos pacientes (PLATT *et al.*, 1994; WILLIAMS *et al.*, 2018).

3.3.7 Tratamento

A prevenção de infecções, principalmente as bacterianas, e o tratamento das crises de dor e danos a diversos órgãos, desde o início têm sido o principal tratamento para a maioria dos pacientes com AF, devido a incidência de infecções bacterianas serem bastante graves e fatais com alta frequência nos primeiros anos de vida (BOOTH *et al.*, 2010). Portanto, tem sido amplamente utilizado a profilaxia com penicilina e vacina para *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, embora essas medidas ainda não sejam completamente eficientes para eliminar o risco elevado de mortalidade por essas infecções nesses pacientes (MARTIN *et al.*, 2018; NAVALKELE *et al.*, 2018).

A hidroxioureia (HU) é a droga mais utilizada para o tratamento de pacientes com AF, licenciada pela US Food and Drug Administration. Ela é um agente quimioterápico que inicialmente foi utilizado para o tratamento de cânceres e passou a ser empregada na AF há cerca de 3 décadas. A HU inibe a ribonucleotideo redutase, enzima envolvida na síntese de DNA. A HU reduz neutrófilos, reticulócitos, contagem de plaquetas e citocinas, que ajudam a reduzir os processos de vaso-oclusão. Além disso, o fator de mais destaque no uso da HU é a indução terapêutica da síntese de HbF, que implica em vários benefícios para esses pacientes, os quais já foram citados nessa revisão, melhorando a qualidade de vida e sobrevida dos pacientes (PLATT *et al.*, 1984; PRESSIAT *et al.*, 2020). Apesar desses benefícios, a HU não é 100% eficaz para mitigar os problemas provenientes da AF, onde, em alguns pacientes, a HU tem sua eficácia limitada e, em outros, pode causar alguns efeitos adversos quando utilizada por longos períodos, portanto, a corrida para desenvolver novas drogas que, principalmente, estimulem a HbF e reduzam os sintomas de forma mais eficiente são necessárias (PESLAK *et al.*, 2020).

A transfusão crônica também é utilizada em alguns grupos de pacientes. Isso gera custos imensos para o sistema de saúde, para reduzir o risco de AVE. Em crianças, essa indicação é realizada a partir do monitoramento pelo Doppler transcraniano (DTC), em que a transfusão crônica pode gerar uma redução de 92% no risco de AVE em crianças com DTC ≥ 200 cm/s, porém, esse é um processo que pode ser completamente reversível, quando cessada a terapia transfusional (DEBAUN *et al.*, 2014). Porém, a transfusão também tem seus riscos, como sobrecarga secundária de ferro e reações hemolíticas causadas pela aloimunização e rejeição de antígenos (CHOU, 2013).

Estudos de ensaio clínico estão concentrados em desenvolver novas drogas que estimulem a HbF e que impeçam a polimerização da HbS no interior do eritrócito: já que a polimerização é o centro de toda as complicações clínicas. A terapia gênica também vem crescendo cada vez mais como forma de tratamento definitivo para os pacientes, porém, muito ainda tem que ser avaliado sobre suas consequências (WILLIAMS *et al.*, 2018).

Apesar de uma doença de base única, a complexidade para descobrir um tratamento ou uma cura efetiva é muito grande. Dos mais de 30 anos de estudos envolvendo a AF, apenas a transfusão crônica de sangue, principalmente para os casos susceptíveis ao desenvolvimento de AVE, e a terapia com hidroxiuréia foram implementadas com maior efetividade. avanços tecnológicos têm levado ao desenvolvimento de novos medicamentos que abordem diferentes aspectos da fisiopatologia da AF, porém, esses ainda não são amplamente utilizados na prática clínica nos pacientes (TELEN, 2016), assim a descoberta de marcadores genéticos e moléculas que possam ser futuros alvos terapêuticos são de suma importância para a AF e, aqui, citamos como moléculas promissoras as metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores teciduais endógenos (TIMPs) devido a disponibilidade de informações a partir de estudos prévios e também as funções biológicas em que essas moléculas atuam.

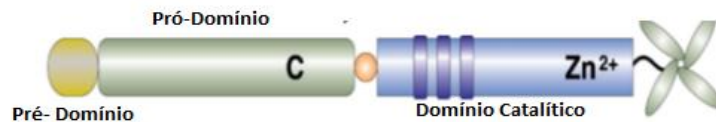
3.4 METALOPROTEINASES DA MATRIZ (MMPS) E SEUS INIBIDORES TECIDUAIS (TIMPS)

As metaloproteinases da matriz (MMPs) fazem parte de uma família multigênica de endopeptidases dependentes de metais, capazes de degradar a matriz extracelular

(MEC), a membrana basal e seus componentes, desempenhando uma função essencial no mecanismo de regulação da homeostase da matriz extracelular de humanos. As atividades dessas moléculas podem regular a atividade de outras proteases, citocinas, ligantes de superfície celular e fatores de crescimento (BODE *et al.*, 1999; ROY, 2019). Exercem, ainda, importante papel na mediação da remodelação do colágeno, sendo, com isso, fundamentais no controle da destruição tecidual (MUNHOZ, 2014).

Em sua conformação química, elas possuem um peptídeo sinal amino-terminal, um pró-domínio e um catalisador dependente de zinco Zn^{2+} , que medeia sua interação enzimática com os TIMPs (Inibidores teciduais de Metaloproteinases) e sua associação com os receptores celulares (**Figura 7**). São sintetizadas e processadas para sua forma ativa por meio da remoção de um peptídeo amino-terminal. A maioria das MMPs também possuem um domínio que confere especificidade de substrato. (VU, 2000; ROY, 2019).

Figura 7- Representação esquemática da estrutura básica de uma Metaloproteinase



Fonte: Adaptado de VU *et al.* (2000)

Na literatura são descritas mais de 20 MMPs, separadas de acordo com a especificidade ao substrato da MEC que degradam e seu perfil estrutural. Assim são classificadas como: Colagenases (MMP-1, 8, 13 e 18), Estromelinas (MMP- 3, 10, 11, 12), Matrilisinas (MMP-7 e 26), MT – MMPs (MT- MMP-14, 15, 16, 17, 24 e 25) e Gelatinases (MMP-2 e 9) (NAGASE, 2006; MOHD, *et al.*, 2013).

As funções fisiológicas que as MMPs, juntamente com outras proteinases extracelulares em pessoas saudáveis são: remodelamento dos ossos, cicatrização de feridas, angiogênese, reposição celular, remielinização, restabelecimento de conectividade e integridade neurovascular, reações de defesa imunológica do hospedeiro, regulação de respostas inflamatórias, reprodução, fertilização e

desenvolvimento (NYBERG *et al.*, 2006; OWEN; CAMPBELL, 1999; STERNLICHT; WERB, 2001; WOESSNER, 1991; NEWBY, 2005; HUNTLEY, 2012).

A inflamação aguda e crônica são caracterizadas por vários processos fundamentais, incluindo exsudação de proteínas plasmáticas, recrutamento de leucócitos e ativação de mediadores inflamatórios derivados de células e plasma. A expressão aumentada das MMPs foi observada em quase todas as doenças humanas em que a inflamação está presente, tendo papel na defesa, lesão, inflamação e reparação (PARKS *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; NATHAN, 2002; WHELAN, 2004; SIEREVOGE, 2003).


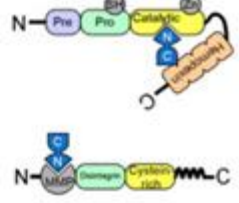

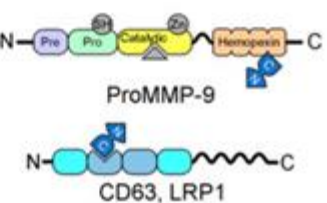

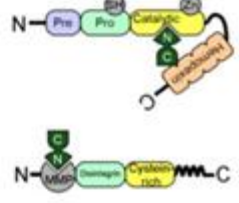

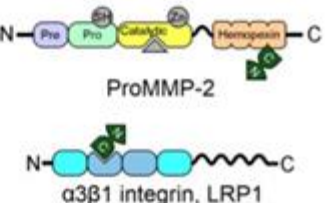

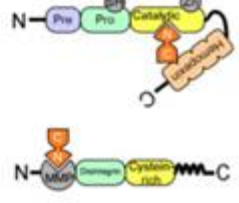

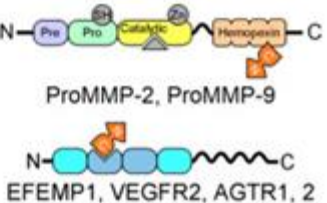

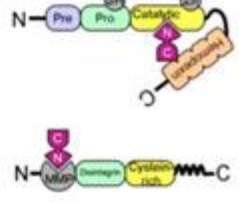

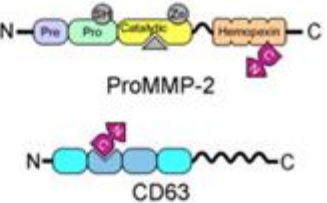
A clivagem por MMP de substratos proteicos específicos resulta em um ganho de função, e esses substratos são importantes na ativação ou amplificação da resposta inflamatória, sendo a chave principal para a migração de leucócitos. Foi observado que as MMPs têm atividade de ativar *in vitro* o fator de necrose tumoral (TNF), uma potente citocina pró-inflamatória que é expressa em células T e macrófagos (BLACK *et al.*, 1997; MOSS *et al.*, 1997).

As MMPs são reguladas na transcrição, que pode ser induzida por citocinas e fatores de crescimento, e também inibida por ativação enzimática, que ocorre extracelularmente através de proteinases plasmáticas ou de outras MMPs. Na inibição de sua atividade proteolítica, pode ocorrer de forma exógena por meio de moléculas sintéticas ou endógenas não específicas e específicas, essa mediada pela ação dos Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs) (KESSENBROK *et al.*, 2010).

Os TIMPs são uma família de proteínas compostas por 184-194 aminoácidos e possuem quatro membros homólogos (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4). Estão localizados juntamente com proteínas da superfície celular. Seu poder de inibição está ligado à sua porção amino-terminal, que forma uma espécie de crista na proteína, causando o deslocamento do Zn^{2+} , átomo necessário para a hidrólise da ligação peptídica das MMPs (ARPINO BROCK; GILL, 2015; JACKSON *et al.*, 2016).

As TIMPs inibem seletivamente diferentes tipos de MMPs (**figura 8**), além disso, são importantes para captação/remoção das MMPs do ambiente extracelular. Assim, as TIMPs podem atuar em conjunto com as MMPs nas moléculas de adesão celular, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (ARPINO *et al.*, 2015; WANG; KHALIL, 2018).

Figura 8 - Localização e interações entre inibidores de tecido de metaloproteínas de matriz (TIMPs) e metaloproteínas de matriz (MMPs). Todos os TIMPs são secretados, mas apenas o TIMP-3 é incorporado à matriz. Estruturalmente, os TIMPs são compostos por dois domínios que empacotam lado a lado (domínios N-terminal e C-terminal). O domínio N-terminal é, algumas vezes, referido como "domínio inibitório". TIMP-1 inibe MMP-1–3 e MMP-7–9; TIMP-2 inibe MMP-2, MMP-9, MMP-14 e metaloproteases de matriz tipo membrana 1 (MT1-MMP); TIMP-3 inibe MMP-2 e MMP-9; e, finalmente, TIMP-4 inibe MMP-2, MMP-26 e MT1-MMP. Além disso, os TIMPs interagem com as proformas de MMPs de uma maneira não inibitória e também têm funções independentes da inibição de MMP por ligação direta aos receptores de superfície celular (TIMP-1 a CD63; TIMP-2 a $\alpha\beta 1$ integrina e LRP1; TIMP-3 para EFEMP1, VEGFR2 e AGTR1,2; e TIMP-4 a CD63).

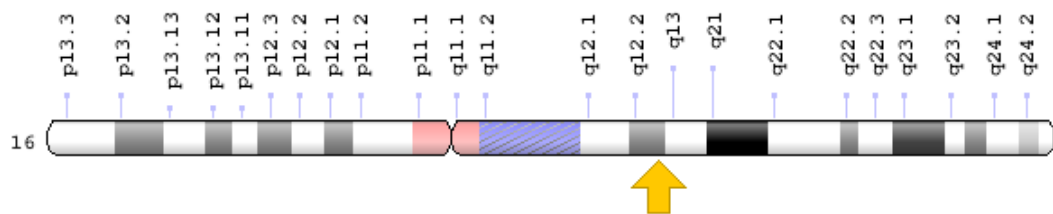
	Localização	Inibições	Ligações
TIMP-1	 <p>Superfície solúvel e celular</p>	 <p>MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9</p>  <p>ADAM-10</p>	 <p>ProMMP-9</p> <p>CD63, LRP1</p>
TIMP-2	 <p>Superfície solúvel e celular</p>	 <p>MMP-2, MMP-9, MMP-14, MT1-MMP</p>  <p>ADAM-12</p>	 <p>ProMMP-2</p> <p>$\alpha\beta 1$ integrin, LRP1</p>
TIMP-3	 <p>Matriz extracelular e superfície celular</p>	 <p>MMP-2, MMP-9</p>  <p>ADAM-17, ADAM-10, ADAMTS4</p>	 <p>ProMMP-2, ProMMP-9</p> <p>EFEMP1, VEGFR2, AGTR1, 2</p>
TIMP-4	 <p>Superfície solúvel e celular</p>	 <p>MMP-2, MMP-26, MT1-MMP</p>  <p>ADAM-28</p>	 <p>ProMMP-2</p> <p>CD63</p>

Fonte: CABRAL-PACHECO *et al.* (2020, Tradução nossa).

3.4.1 Metaloproteinase de Matriz 2 (MMP- 2) e TIMP-2

A Metaloproteinase de Matriz 2 (MMP-2), também conhecida como gelatinase A, faz parte da subfamília das gelatinases. É uma proteína codificada pelo gene *MMP2* e secretada pelo tecido adiposo, capaz de degradar o colágeno tipo IV, principal componente estrutural da membrana basal. O gene *MMP2* está localizado no braço longo do cromossomo 16 (16q13.2), possuindo 13 éxons (**Figura 9**). O SNP -1306 C/T foi encontrado na região promotora do gene e pode influenciar a sua atividade ou expressão (ADABI *et al.*, 2015; BAUSTERS *et al.*, 2015; MARTIGNETTI *et al.*, 2001; WEBB *et al.*, 2017).

Figura 9 - Posição cromossômica do Gene *MMP2*.

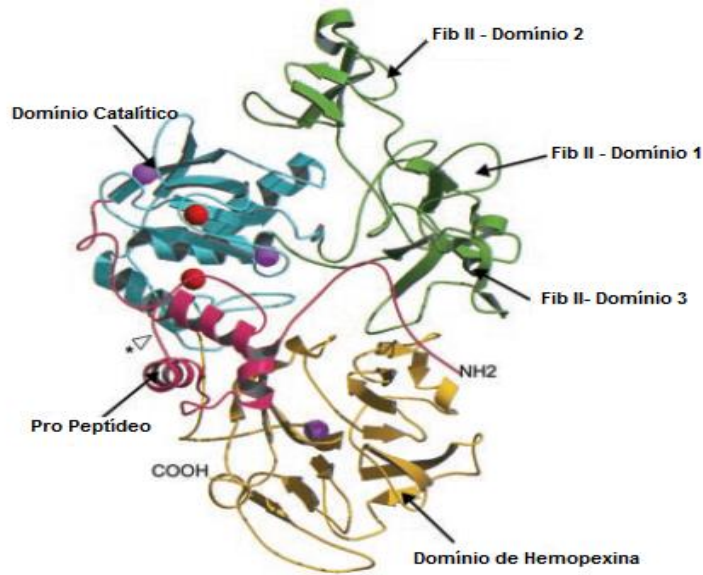


Fonte: Gene Cards, the human gene database. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MMP2#location>, acesso em 25 de agosto de 2021.

Estudos constataram a presença dessa molécula em diversos tecidos e que os polimorfismos no gene *MMP2* podem estar envolvidos no comportamento metastático tumoral e no desenvolvimento de muitos tipos cancerígenos, como câncer de mama, pulmões e câncer do colo do útero. A atividade da MMP-2 pode ser regulada por condições como outras MMPs, por meio dos inibidores de MMPs, como por exemplo o TIMP-2 e o RECK, e dos polimorfismos que alteram a atividade transcricional do gene. (GAO *et al.*, 2019; HSU *et al.*, 2019; VISSE; NAGASE, 2003).

A MMP-2 é principalmente expressa no mesênquima celular, durante o processo de desenvolvimento e regeneração tecidual. Como a maioria das MMPs, ela possui um pré-domínio, um pró-domínio e um domínio catalítico, além disso, contém três domínios de fibronectina tipo II inseridos em seu domínio catalítico (**Figura 10**). Sua ativação fisiológica pode ser derivada das MT-MMPs, que clivam um sítio específico do pró-peptídeo (MORGUNOVA, 1999; ROY *et al.*, 2019).

Figura 10 - Estrutura da Metaloprotease de Matriz 2 (MMP2).

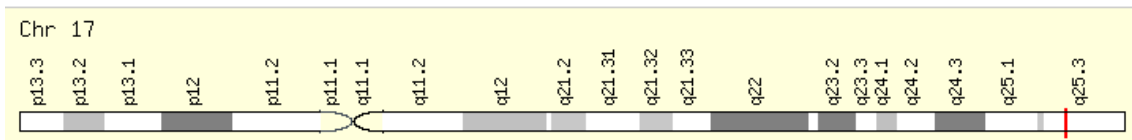


Fonte: Adaptado de MORGUNOVA (1999)

A ativação do zimogênio de MMP2 (proMMP2) ocorre na superfície celular por meio da formação de um complexo entre uma MMP e o TIMP2, através de seus domínios C terminais. Durante esse processo, o domínio inibitório do TIMP2 que se liga a MT-MMP e a proMMP2 é então ativada por uma metaloprotease de matriz livre de inibidores teciduais. Neste caso, o complexo TIMP2/MT-MMP atua como um receptor para o proMMP2 e o inibidor tecidual não pode ser substituído por nenhum outro membro da família, haja vista que eles não inibem a metaloprotease de matriz e não podem se ligar ao proMMP-2 (BREW *et al.*, 2000; VISSE; NAGASE, 2003).

O Inibidor de Metaloprotease de Matriz 2 (TIMP-2) é uma proteína codificada pelo gene *TIMP2*. Este gene é constitutivamente expresso e está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q25.3) (**Figura 11**). É capaz de inibir a atividade proteolítica em tecidos submetidos à remodelação da MEC e de suprimir a proliferação de células endoteliais como resposta à fatores angiogênicos (EDELSTEIN, 2017; MASCIANTONIO *et al.*, 2017)

Figura 11 - Localização cromossômica do gene *TIMP2*



Fonte: Gene Cards, the human gene database. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TIMP2>, acesso em 25 de agosto de 2020

A MMP-2 e TIMP-2 são importantes tanto no desenvolvimento normal, quanto em numerosas patologias inflamatórias. Sendo assim, o estudo dos polimorfismos do *MMP2* e *TIMP2* em crianças com AF é importante para identificar genótipos que codificam níveis variáveis das proteínas MMP-2 e TIMP-2, respectivamente, devido a importância desta proteína em processos biológicos e sua implicação em doenças inflamatórias crônicas, como é o caso da AF.

3.4.2 Metaloproteinase de matriz 9 (MMP- 9) e TIMP-1

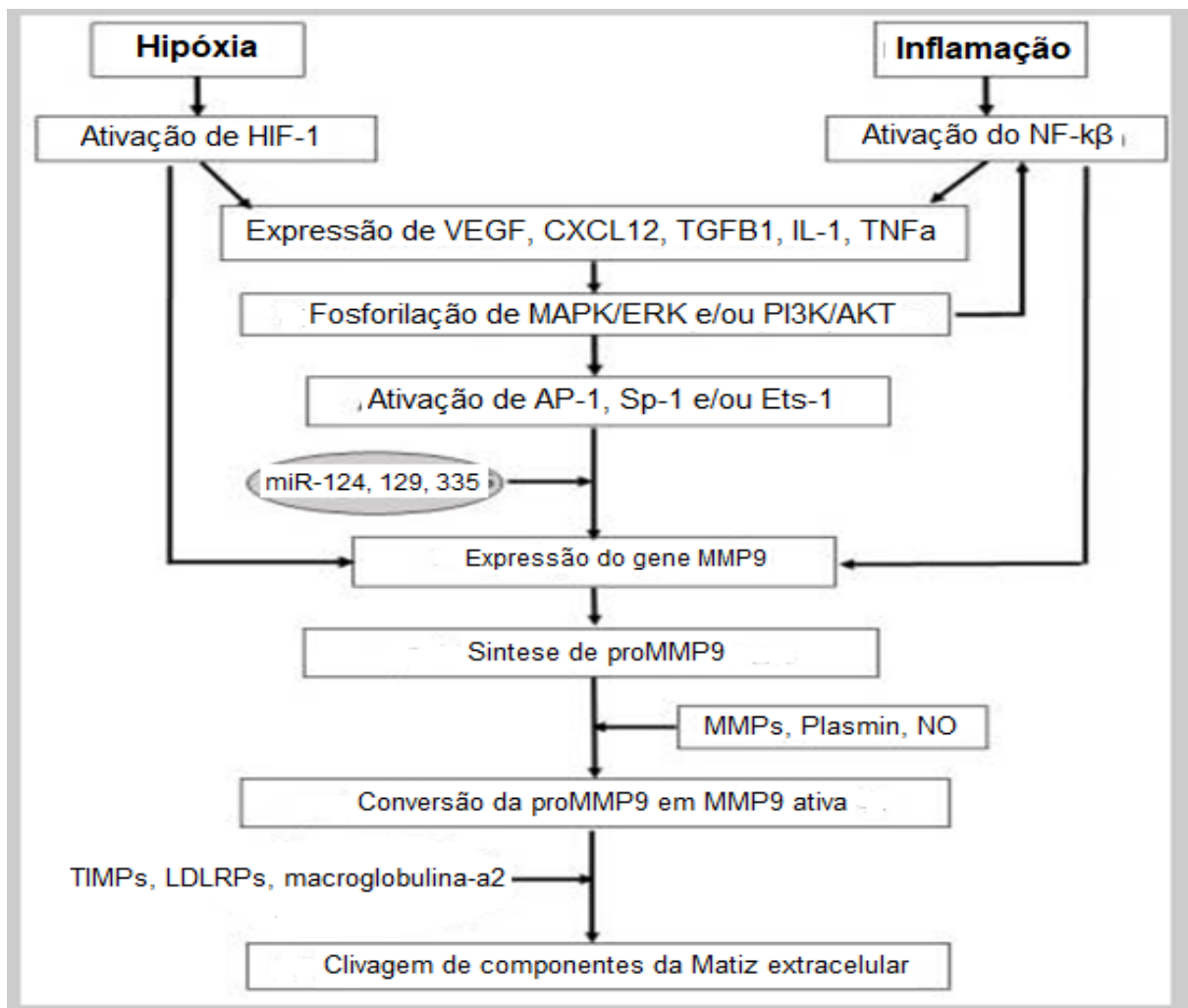
A MMP-9 é uma proteína de 92 kDa em sua forma inativa, pro-MMP-9, e de 82 kDa na sua forma ativa (VANDOOREN *et al.*, 2012). Assim como a MMP-2, a MMP-9 apresenta um domínio O-glicosilado e três repetições de fibronectina (VAN DEN STEEN *et al.*, 2006).

A MMP-9 pode ser ativada por uma série de moléculas que podem ser desde outras MMPs, como MMP-2, MMP-3, MMP-13, MMP-17, MMP-26, a enzimas proteolíticas, ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA), plasmina. Ademais, o pH baixo, o dodecilsulfato de sódio (SDS), outros agentes desnaturantes e o tratamento térmico também podem ativar a MMP-9 pela clivagem de seu predomínio (SPRINGMAN *et al.*, 1990; Li *et al.*, 2020).

Os TIMPs são os principais inibidores de MMPs *in vivo*. O domínio C-terminal de TIMP-1 inibe fortemente a MMP-9, ligando-se ao domínio hemopexina da pró-MMP-9, formando um complexo compacto e inibindo a ativação da MMP-9. Além disso, a MMP-9 e o TIMP-1 são coexpressos em muitos tipos celulares e são secretados como um complexo MMP-9/TIMP-1, gerando um equilíbrio, mas tal equilíbrio pode ser interrompido em certas condições patológicas, como o exemplo da aterosclerose, cuja atividade alterada de MMP-9 pode provocar a ruptura da placa pela remodelação da MEC (LI *et al.*, 2020; ARPINO *et al.*, 2015; NAGASE *et al.*, 2014).

A MMP-9 desempenha um papel importante na inflamação, pois é constitutivamente expressa por neutrófilos e macrófagos (VANDOOREN *et al.*, 2013). Já outras células, como fibroblastos, osteoblastos e células epiteliais, endoteliais, dendríticas e células T, produzem MMP-9 a partir de estímulos com citocinas inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento. Dentre os principais, estão a interleucina-1, fator de necrose tumoral, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento transformador β 1, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o ligante de quimiocina CXC 12 (CXCL12) (**Figura 12**) (BARILLARI, 2020; DU *et al.*, 2019; DING *et al.* 2019; CHEN *et al.*, 2016; MUSCELLA *et al.*, 2019; WANG, 2016; SHEN *et al.*, 2013).

Figura 12 - A via MMP-9. Nos retângulos, são destacadas as principais moléculas e vias de sinalização que resultam na expressão ou ativação da MMP-9; nas elipses, os antagonistas endógenos de MMP-9 são listados. As setas simbolizam as direções das conexões. Abreviaturas: AKT, proteína quinase B; AP, proteína ativadora; CXCL, ligante de quimiocina CXC; MCE, matriz extracelular; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; HIF, fator induzível por hipóxia; IL, interleucina; LDLRP, proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade; MAPK, proteína quinase ativada por mitogênio; miR, microRNA; MMP, metaloproteinase de matriz; NF-kB, fator nuclear kappa B; NO, óxido nítrico; PI3K, fosfoinositido 3 quinase; Sp, proteína de especificidade; TGF, fator transformador de crescimento; TIMP, inibidor de tecido da metaloproteinase da matriz; TNF, fator de necrose tumoral; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular.

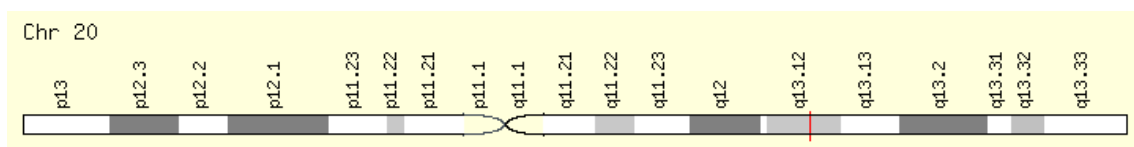


Fonte: Barillari. (2020, tradução nossa).

Variações nos níveis de expressão da MMP-9 têm sido avaliadas em diversas doenças, uma das mais estudadas é a aterosclerose e nos processos inflamatórios em que a MMP-9 está envolvida, que podem causar a instabilidade da placa de ateroma e fatores de risco para complicações cardiovasculares (LI *et al.*, 2020). O papel da MMP-9 também tem sido avaliado em doenças pulmonares, asma, diabetes, doenças renais, neurológicas e diversos tipos de câncer (GRZELA *et al.*, 2015; CABRAL-PACHECO, *et al.*, 2020).

O gene *MMP-9* está localizado no cromossomo 20q11.2 – q13.1 (**Figura 13**) (ZOU *et al.* 2019). Diversos polimorfismos têm sido estudados com a finalidade de avaliar o gene *MMP-9* como possível biomarcador genético para susceptibilidade às diversas doenças em que é notado alteração da MMP-9 em seus processos fisiopatológicos. O polimorfismo rs17576 *MMP-9* (A/G) já revelou associação com doenças inflamatórias e crônicas em que alguns processos fisiopatológicos são parecidos com os que ocorrem na AF, como na artrite, hipertensão, doenças cardiovasculares. Outros exemplos podem ser citados: aumento de câncer em mulheres na pós-menopausa (OLIVEIRA *et al.*, 2020), risco de aneurisma da aorta (LI *et al.*, 2019), suscetibilidade à asma em diferentes populações (ZOU *et al.*, 2019), também sua associação com risco de hemorragia subaracnóide (WANG *et al.*, 2018) e diabetes tipo 2 (SARAVANI *et al.* 2017).

Figura 13 - Localização do gene *MMP-9*.



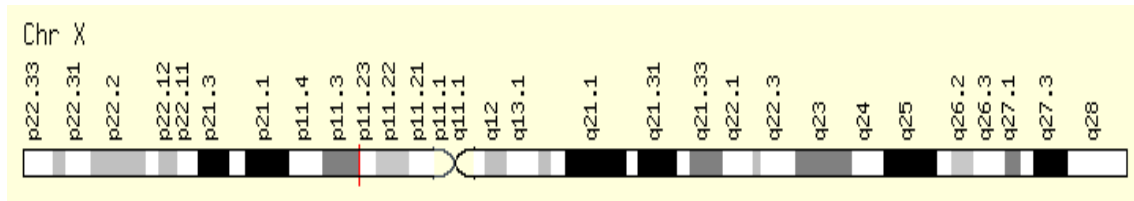
Fonte: Gene Cards, the human gene database. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MMP9>, acesso em 25 de agosto de 2022

A TIMP-1 é secretada pela maioria das células e tecidos do corpo, apresentando níveis variáveis de acordo com a patologia envolvida, pois na mama, cérebro, pulmões, fígado, rins, cólon, pele, ovários e coração já foram observados superexpressão da TIMP-1. Além disso, a TIMP-1 é o inibidor da MMP-9, a qual apresenta maior afinidade de ligação (CABRAL-PACHECO *et al.*, 2020).

O gene que codifica a TIMP-1 está localizado no cromossomo Xp11.3 (**Figura 14**), e possui três polimorfismos, sendo o mais importante o *TIMP-1* (372 T/C) (rs4898) no éxon 5, que vem sendo estudado em diversas patologias (NAYCHOV *et al.*, 2013).

Como exemplo, o alelo T em homens pode diminuir o risco de Ceratocone (doença que afeta a córnea) em comparação ao alelo C (YARI *et al.*, 2020).

Figura 14 - Localização do gene *TIMP-1*.



Fonte: Gene Cards, the human gene database. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TIMP1&keywords=TIMP1>

O papel do conjunto MMP-9/TIMP-1 e MMP-2/TIMP-2, merecem uma atenção na manutenção da homeostase e no processo de várias doenças. A regulação anormal e o desbalanço dos níveis destas proteínas, como têm sido descritos na literatura, implicam junto a outros fatores em condições patológicas, que incluem inflamação, destruição de tecido, fibrose, angiogênese anormal, enfraquecimento da matriz, ativação microglial, doenças autoimunes, carcinogênese, adesão, proliferação celular e migração e/ou apoptose, o que já foi destacado em doenças como, diabetes mellitus, doenças gestacionais, nefropatia, cicatrização de feridas, doenças renais, doenças neurodegenerativas, esclerose múltipla, e dentre muitas outras (AMALINEI *et al.* 2010; NAGASE *et al.* 2006; CABRAL-PACHECO *et al.*, 2020).

Por não existir tratamento específico, de forma eficiente, que contemple todos os pacientes com AF, o acompanhamento ambulatorial periódico é essencial. A identificação de polimorfismos de genes que codificam proteínas envolvidas em processos biológicos frequentes nos EVO em pacientes com AF, podem vir a ser utilizados como biomarcadores para a identificar precocemente os eventos EVO na AF, auxiliando os profissionais de saúde no melhor manejo clínico desses pacientes e, conseqüentemente, evitando possíveis complicações decorrentes desses processos, o que, por sua vez, melhoraria a qualidade de vida e sobrevida destes pacientes.

Frente a tudo que foi exposto nesta revisão e devido a infinidade de funções biológicas em que as MMPs e TIMPs estão presentes, como em inúmeros distúrbios inflamatório, e remodelamento endotelial, polimorfismo nos genes que codificam estas

proteínas e seus inibidores (TIMPs) são potenciais candidatos para utilização como biomarcadores para os ventos vaso-oclusivos (EVO) nos pacientes com AF.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

O presente trabalho trata-se de um estudo analítico transversal com grupos de comparação, contendo duas etapas principais: na primeira, foi realizada a análise dos polimorfismos gênicos do tipo SNP e, a segunda, análise da expressão gênica de mRNA. Todas as abordagens avaliando os EVOs em jovens com AF.

4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram avaliados 251 jovens com AF até os 18 anos de idade participantes da triagem neonatal, diagnosticadas no Hemocentro de Pernambuco (HEMOPE), por meio de eletroforese da Hemoglobina e Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) (BioRad, Hercules, CA, USA). Dentro do protocolo deste programa, os pacientes foram vacinados contra pneumococos (Pneumo 7 - Wyeth Pharmaceuticals Inc. USA) e meningococos (Meningitec - Wyeth Pharmaceuticals, UK) e, também, fizeram o uso de penicilina (dose 4.000 U/Kg/dia) até 5 anos de idade, originando uma população mais homogênea para o estudo. Os dados clínicos, referentes aos pacientes, foram coletados de prontuários padronizados disponibilizados pelo arquivo médico da Fundação HEMOPE.

O grupo de casos foi composto por pacientes AF (genótipo HbSS) divididos entre os grupos: AVE+ (pacientes com histórico de acidente vascular encefálico isquêmico); ultrassonografia doppler transcraniana (DTC) Alto Risco (AR) para AVE; DTC condicionante (cond.) para AVE; CVD (doença cerebrovascular) (pacientes que tiveram histórico de AVE ou valores de DTC alterados); CVO 2 a 5 (pacientes que apresentaram de 2 a 5 eventos de crise vaso-oclusiva por ano); CVO >5 (pacientes que apresentaram mais do que 5 eventos vasos-oclusivos por ano). E estes grupos foram comparados a um grupo normal, composto por pacientes também com AF que tiverem menos de dois eventos vaso-oclusivos por ano, e apresentaram valores normais de DTC. Todos os valores primários para AVE foram confirmados com base na ultrassonografia doppler transcraniana. E os valores de DTC: Normal (menor que 170 cm/s); Condicionante (170-199 cm/s); alto risco (≥ 200 cm/s).

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Jovens com AF, participantes da triagem neonatal desde 2002, atendidos no ambulatório de hemoglobinopatia da Fundação HEMOPE. Para a análise de associação com os EVOs. Foram excluídos pacientes que passaram por transfusão sanguínea nos últimos 3 meses, bem como pacientes que não realizavam as consultas regulares de rotina.

4.4 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

As amostras de sangue periférico dos pacientes foram coletadas por punção venosa a vácuo em tubos *Vacutainer*, contendo anticoagulante EDTA. As amostras foram processadas em até 6 horas.

4.5 SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCS)

As Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) foram obtidas por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (*Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia*). As amostras de sangue foram diluídas em PBS (tampão fosfato salino) na proporção de 1:1, transferidas para tubos cônicos contendo Ficoll-Hypaque, na mesma proporção do passo anterior, e centrifugadas a 2.200rpm por 30 minutos a 20°C. A camada de células obtidas, após centrifugação, foi coletada com pipeta de transferência, lavada 2x em PBS e centrifugada a 1.500 rpm por 10 min a 20°C. Em seguida, as células foram ressuspensas em tampão PBS 1x preparado com água contendo Dietil pirocarbonato (DEPC). Uma alíquota de 100 µl da suspensão de células foi retirada para avaliação da viabilidade e quantificação no contador automático Vi-CELL™ (*Beckman Coulter, Brea, CA*), por meio do método *Trypan Blue*.

4.6 EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO (DNA GENÔMICO E mRNA TOTAL)

A extração de DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos pela técnica de fenol-clorofórmio modificado, descrita por Davis *et al.*, 1986. Para a obtenção de mRNA, foi utilizado o método de extração em Trizol (Invitrogen, UK), a partir de

PBMCs, que englobam os linfócitos, monócitos e os macrófagos, de acordo com as recomendações do fabricante.

4.7 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

As amostras de mRNA foram quantificadas, utilizando a tecnologia de espectrofotometria, com o equipamento NanoDrop 2000 (ThermoScientific), a fim de mensurar a concentração do RNA e verificar contaminantes na amostra. Em seguida, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose, com o objetivo de analisar a integridade da amostra. Para obtenção do cDNA, foi utilizado o kit Megaplex (Applied Biosystems, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.8 DETECÇÃO DAS VARIANTES POLIMÓRFICAS

Para a realização da detecção dos polimorfismos *MMP2*-1306 C/T (rs243864), *MMP9* C/T (rs17576), *TIMP1* +372 C/T (rs4898) e *TIMP2* -418 G/C, (rs7501477), foi utilizada a metodologia do PCR em tempo real, por meio do sistema TaqMan®, que oferece o resultado da genotipagem de maneira rápida e simples. Cada ensaio de detecção inclui 2 sondas MGB (*Minor Groove Binder*) alelo específica, contendo fluoróforos distintos e um par *primers* para a detecção do alvo. O sistema TaqMan® se alinha exclusivamente no genoma para fornecer alta especificidade para o alelo de interesse. As sondas têm em sua estrutura molecular um *Quencher* que inibe o sinal emitido pelo fluorocromo ou repórter e, assim que ocorre o pareamento e hidrólise da sonda, o composto fluorescente é liberado, proporcionando liberação de energia que é captado pela máquina e analisado em um gráfico. Dessa forma, a detecção da mutação é observada. Para realização desta técnica, foi utilizada a PCR em tempo real e o equipamento utilizado foi o Quantistudio5 (Thermo Scientific, CA, USA), disponível para utilização no Núcleo de Plataformas Tecnológicas-NPT do Instituto Aggeu Magalhães- IAM.

4.9 EXPRESSÃO DOS GENES *MMP-2*, *MMP-9*, *TIMP-1* E *TIMP2*

O ensaio de expressão gênica de *MMP-2*, *MMP-9*, *TIMP-1* e *TIMP-2*, foi realizado a partir do cDNA. A quantificação relativa dos mRNAs foi realizada por meio

da técnica de PCR em tempo real, utilizando-se a tecnologia TAQMAN® Assays (Applied Biosystems, CA, USA), com sondas específicas e sensíveis para detecção de forma quantitativa dos mRNAs de interesse. O equipamento utilizado foi o Quantistudio5 (Thermo Scientific, CA, USA). O cálculo da expressão relativa foi realizado por meio do método $\Delta\Delta Ct$ pelo software expressionSuite v3.3 (Life Technologies, CA, USA). Para normalização, foi utilizada a estratégia de genes endógenos (B-actin).

4.10 MÉTODOS DE ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram armazenados em computador no programa PRISMStatistics v.6.0. A prevalência de diferentes genótipos foi comparada pelo teste Qui-quadrado. As frequências alélicas foram estimadas pelo método da contagem gênica pelo software pLINK, que foi utilizado para montagem dos mapas de desequilíbrio de ligação e testes estatísticos. O teste Qui-quadrado foi utilizado para verificar se a distribuição genotípica está de acordo com a hipótese do equilíbrio de Hardy-Weinberg. A existência de associações entre variáveis categóricas foi avaliada pelos testes Qui-quadrado de Pearson, ou exato de Fisher, quando apropriado. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$. A magnitude destas associações foi estimada como *OddsRatio* (OR), utilizando intervalos de confiança de 95%. Para comparação das variáveis contínuas, entre dois grupos, foi aplicado o teste t-Student ou teste não paramétrico de Mann-Whitney, e para comparação entre mais de dois grupos foi aplicado o teste ANOVA ou Kruskal Wallis, quando apropriado. O programa PRISMStatistics v.6.0. (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA) foi utilizado para estas análises.

4.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Complexo Hospitalar HUOC/PROCAPE CAAE (94534218.0.0000.5192) (ANEXO B). Os responsáveis pelos participantes do projeto, após informação, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5 RESULTADOS

Todos os indivíduos são jovens do nordeste do Brasil com AF e eram homocigotos para o genótipo HbSS, com base nas informações obtidas dos prontuários médicos. Todas as análises foram realizadas em pacientes de ambos os sexos, com a média de idade equilibrada entre os grupos. Apenas os valores de hemoglobina (Hb) foram estatisticamente diferentes entre os grupos: IS+ (7,731 g/dL \pm 0,8130); DTC Alto Risco (7,490 g/dL \pm 0,9714); Condicionante (7,781 g/dL \pm 0,7722) e o grupo controle: Normal (8,093 g/dL \pm 0,9232), [p=0,0078]. Também o uso de Hidroxiuréia (HU) foi mais prevalente nos grupos de caso em comparação ao controle [p=< 0,0001]. As demais variáveis não mostraram valores médios diferentes entre os grupos estudados (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes com SCA (genótipo HbSS).

AVE+= pacientes com histórico de acidente vascular encefálico; AR= pacientes com alto risco para AVE; Cond. = Pacientes condicionantes para AVE; Hb= hemoglobina; TGO= Transaminase glutâmico oxalacética; TGP= Transaminase glutâmico pirúvica; BT= Bilirrubina total; HU= Hidroxiureia; HU S= sim; HU N= não. Sexo M= masculino; Sexo F= feminino. Os valores de p foram considerados significativos

	AVE+ (n=16)	AR (n=23)	Cond. (n=43)	Normal (n=142)	p
Idade (Anos)	14,34 (3,965)	14,55 (3,794)	14,75 (3,369)	13,70 (3,344)	0,2779
Hb g/dL	7,731 (0,8130)	7,490 (0,9714)	7,781 (0,7722)	8,093 (0,9232)	0,0078
Leucócitos x100 (/uL)	200,4 (91,14)	165 (35,61)	151,8 (40,23)	155,6 (55,60)	0,4104
Plaquetas x1000 (/uL)	433,1 (201,2)	423,6 (106,9)	499,6 (179,1)	470,9 (144,1)	0,5213
Hemácias (M/mm ³)	2,732 (0,2041)	2,547 (0,2759)	2,519 (0,3712)	2,726 (0,5093)	0,1017
TGO (U/L)	54,33 (9,018)	27,60 (13,39)	42,73 (10,43)	43,43 (17,31)	0,1074
TGP (U/L)	21 (6,083)	14,80 (4,919)	16,92 (3,872)	21,29 (12,87)	0,5178
BT (mg/dL)	2,596 (2,460)	2,297 (1,408)	1,942 (1,003)	2,123 (1,412)	0,958
Sexo F	9 (56%)	13 (56%)	23 (53%)	70 (49%)	0,7588
HU S/N	12 (75%)	20 (87%)	36 (84%)	66 (46%)	< 0,0001

quando <0,05, e os testes aplicados para as análises foram: Kruskal-Wallis e Qui-quadrado.

Foram genotipados 251 pacientes, para os SNPs rs1799750 *MMP1*, rs2285053 *MMP2*, rs243865 *MMP2*, rs17576 *MMP9*, rs4898 *TIMP1* e rs7501477 *TIMP2*. Há variação no N entre os grupos de associação devido à falta de informação dos eventos clínicos nos prontuários médicos dos pacientes, e não foi possível genotipar alguns indivíduos. Cerca de 49% dos pacientes são do sexo masculino e 51% do sexo feminino, além disso, o estudo foi composto por pacientes jovens com a média da

idade aproximada de 14 anos. Para todos os SNPs, a distribuição dos genótipos nos grupos de caso e controle estava no equilíbrio de Hardy-Weinberg, $p > 0,05$ (**Tabela 2**). Apenas o SNP rs4898 *TIMP1* apresentou uma distribuição da frequência alélica de T mais elevada no grupo de pacientes com $VOC > 5$ eventos/ano comparado ao grupo controle, com $OR = 1,757$ (1,042 - 2,962), ($p = 0,0452$) (**Tabela 3**). E o genótipo 1G/1G do SNP rs1799750 *MMP1* apresentou maior frequência no grupo de pacientes com alto risco para AVE (avaliado pelo DTC) quando comparado ao genótipo 1G/2G, ($p = 0,0278$), $OR = 3,667$ (1,249- 10,76) (**Tabela 4**). Os demais SNPs não apresentaram associação significativa entre os grupos caso e o controle estudados. Nos grupos de pacientes com AVE e CVD não foi visto diferenças significativas entre as frequências dos SNPs dos genes *MMPs-TIMs* (**Tabela 5 e 6**).

Tabela 2 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg na população de estudo.

Hardy-Weinberg CVO						
CHR	SNP	A1	A2	O(HET)	E(HET)	P
11	rs1799750	G	A	0.4957	0.4994	0.8956
16	rs243865	T	C	0.2468	0.2414	1
16	rs2285053	T	C	0.2393	0.2423	0.7888
17	rs7501477	T	G	0.3333	0.3409	0.7035
20	rs17576	G	A	0.4082	0.4037	1
23	rs4898	C	T	0.5462	0.4949	0.3536
Hardy-Weinberg CVD						
CHR	SNP	A1	A2	O(HET)	E(HET)	P
11	rs1799750	A	G	0.488	0.4994	0.7819
16	rs243865	T	C	0.2585	0.2533	1
16	rs2285053	T	C	0.2108	0.2333	0.2206
17	rs7501477	T	G	0.3122	0.3315	0.401
20	rs17576	G	A	0.4255	0.4002	0.4676
23	rs4898	C	T	0.566	0.4956	0.1737
Hardy-Weinberg DTC						
CHR	SNP	A1	A2	O(HET)	E(HET)	P
11	rs1799750	G	A	0.5126	0.5	0.7778
16	rs243865	T	C	0.2598	0.2543	1
16	rs2285053	T	C	0.2118	0.2342	0.2215
17	rs7501477	T	G	0.3088	0.3299	0.3943
20	rs17576	G	A	0.4225	0.3991	0.5817
23	rs4898	C	T	0.566	0.4956	0.1737
Hardy-Weinberg AVE						
CHR	SNP	A1	A2	O(HET)	E(HET)	P
11	rs1799750	G	A	0.5041	0.4998	1
16	rs243865	T	C	0.243	0.2371	1
16	rs2285053	T	C	0.2419	0.2482	0.6143
17	rs7501477	T	G	0.3347	0.3384	0.8517
20	rs17576	G	A	0.4171	0.415	1
23	rs4898	C	T	0.5397	0.4969	0.3747

CHR= Cromossomo; A1= Minor allele; A2= Major allele; O(HET)= heterozigose observada; E(HET)= heterozigose esperada; AVE= Acidente vascular encefálico; DTC= Ultrassonografia doppler transcraniana; VOC= Crise vaso-oclusiva; CVD= Doença cérebro vascular.

Tabela 3 - Frequência dos SNPs dos genes MMPs-TIMPs nos pacientes com AF e CVO.

rs1799750 MMP1	Total AF (n=230)	CVO<2 (n=139)	CVO 2 a 5 (n=52)	CVO>5 (n=39)	CVO≥2 (n=91)	p1	p2	p3
1G/1G	70(30%)	46(33%)	14(27%)	10(26%)	24(26%)	-	-	-
1G/2G	107(47%)	61(44%)	25(48%)	21(54%)	46(51%)	0,5615	0,3877	0,3169
2G/2G	53(23%)	32(23%)	13(25%)	8(21%)	21(23%)	0,6752	1	0,6748
1G/2G + 2G/2G	160(70%)	93(67%)	38(73%)	29(74%)	67(74%)	0,5204	0,4898	0,349
1G	247(54%)	153(55%)	53(51%)	41(53%)	94(52%)			
2G	213(46%)	125(45%)	51(49%)	37(47%)	88(48%)	0,5513	0,7958	0,5373
rs2285053 MMP2	Total AF (n=234)	CVO<2 (n=138)	CVO 2 a 5 (n=55)	CVO>5 (n=41)	CVO≥2 (n=96)			
CC	173(74%)	102(74%)	44(80%)	27(66%)	71(74%)	-	-	-
CT	56(24%)	34(25%)	10(18%)	12(29%)	22(23%)	0,4445	0,6064	0,9395
TT	5(2%)	2(1%)	1(2%)	2(5%)	3(3%)	0,606	0,4402	0,6981
CT+TT	61(26%)	36(26%)	11(20%)	14(34%)	25(26%)	0,4817	0,417	0,8858
C	420(86%)	256(87%)	98(89%)	66(80%)	164(85%)			
TT	66(14%)	38(13%)	12(11%)	16(20%)	28(15%)	0,7054	0,1849	0,6993
rs243865 MMP2	Total AF (n=235)	CVO<2 (n=137)	CVO 2 a 5 (n=57)	CVO>5 (n=41)	CVO≥2 (n=98)			
CC	173(74%)	95(69%)	45(79%)	33(80%)	78(80%)	-	-	-
CT	58(25%)	39(28%)	11(19%)	8(20%)	19(19%)	0,2421	0,3119	0,1356
TT	4(2%)	3(2%)	1(2%)	0 (0%)	1(1%)			
CT+TT	62(26%)	42(31%)	12(21%)	8(20%)	20(20%)	0,2365	0,2321	0,1079
C	404(86%)	229(84%)	101(70%)	74(90%)	175(89%)			
T	66(14%)	45(16%)	13(9%)	8(10%)	21(11%)	0,2683	0,1898	0,1048
rs17576 MMP9	Total AF (n=196)	CVO<2 (n=106)	CVO 2 a 5 (n=53)	CVO>5 (n=37)	CVO≥2 (n=90)			
AA	101(52%)	50(47%)	27(51%)	24(65%)	51(57%)	-	-	-
AG	80(41%)	48(45%)	22(42%)	10(27%)	32(36%)	0,7703	0,075	0,2087
GG	15(8%)	8(8%)	4(8%)	3(8%)	7(8%)	0,8348	0,9967	1
AG+GG	95(48%)	56(53%)	26(49%)	13(35%)	39(43%)	0,7791	0,0962	0,2371
A	282(72%)	148(70%)	76(72%)	58(78%)	134(74%)			
G	110(28%)	64(30%)	30(28%)	16(22%)	46(26%)	0,828	0,2065	0,3657
rs4898 TIMP1	Total AF (n=235)	CVO<2 (n=138)	CVO 2 a 5 (n=56)	CVO>5 (n=41)	CVO≥2 (n=97)			
TT	98(42%)	55(40%)	20(36%)	23(56%)	43(44%)	-	-	-
CT	67(29%)	42(30%)	15(27%)	10(24%)	25(26%)	0,8778	0,2667	0,4964
CC	70(30%)	41(30%)	21(38%)	8(20%)	29(30%)	0,4659	0,1419	0,8744
CT+CC	137(58%)	83(60%)	36(64%)	18(44%)	54(56%)	0,7084	0,0965	0,5819
T	263(56%)	152(55%)	55(49%)	56(68%)	111(57%)			
C	207(44%)	124(45%)	57(51%)	26(32%)	83(43%)	0,3396	0,0452	0,7139
rs7501477 TIMP2	Total AF (n=234)	CVO<2 (n=138)	CVO 2 a 5 (n=55)	CVO>5 (n=41)	CVO≥2 (n=96)			
GG	144(62%)	81(59%)	39(71%)	24(59%)	63(66%)			
GT	78(33%)	50(36%)	14(25%)	14(34%)	28(29%)	0,1787	0,9668	0,3208
TT	12(5%)	7(5%)	2(4%)	3(7%)	5(5%)	0,789	0,9054	0,8704
GT+TT	90(38%)	57(41%)	16(29%)	17(41%)	33(34%)	0,1571	0,871	0,3497
G	366(78%)	212(77%)	92(84%)	62(76%)	154(80%)			
T	102(22%)	64(23%)	18(16%)	20(24%)	38(20%)	0,1796	0,9385	0,4463

rs4898 TIMP1 alelo T vs C, $p=0,0452$, $OR=1,757$ (1,042-2,962). CVO= Crise vaso-oclusiva, AF= Anemia

	Total AF (n=199)	Normal (n=133)	cond. (n=43)	Alto Risco (n=23)	Cond.+AR (n=66)	p1	p2	p3
rs1799750 MMP1								
1G/1G	57 (29%)	34 (26%)	12 (28%)	11 (48%)	23 (35%)	-	-	-
1G/2G	95 (48%)	68 (51%)	21 (49%)	6 (26%)	27 (41%)	0,914	0,0278	0,1811
2G/2G	47 (24%)	31 (23%)	10 (23%)	6 (26%)	16 (24%)	0,9479	0,5216	0,6471
1G/2G + 2G/2G	142 (71%)	99 (74%)	31 (72%)	12 (52%)	43 (65%)	0,9169	0,054	0,2311
1G	209 (53%)	136 (51%)	45 (52%)	28 (61%)	73 (55%)	-	-	-
2G	189 (47%)	130 (49%)	41 (48%)	18 (39%)	59 (45%)	0,9449	0,2883	0,4973
rs2285053 MMP2								
CC	154 (73%)	102 (74%)	33 (77%)	19 (83%)	52 (79%)	-	-	-
CT	43 (20%)	31 (23%)	9 (21%)	3 (13%)	12 (18%)	0,9664	0,4609	0,5884
TT	6 (3%)	4 (3%)	1 (2%)	1 (4%)	2 (3%)	0,7616	0,7138	0,6759
CT+TT	49 (23%)	35 (26%)	10 (23%)	4 (17%)	14 (21%)	0,9196	0,5615	0,6163
C	351 (86%)	235 (86%)	75 (87%)	41 (89%)	116 (88%)	-	-	-
TT	55 (14%)	39 (14%)	11 (13%)	5 (11%)	16 (12%)	0,8738	0,7027	0,6688
rs243865 MMP2								
CC	147 (72%)	102 (73%)	29 (71%)	16 (70%)	45 (70%)	-	-	-
CT	53 (26%)	34 (24%)	12 (29%)	7 (30%)	19 (30%)	0,7315	0,7693	0,5968
TT	4 (2%)	4 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-	-	-
CT+TT	57 (28%)	38 (27%)	12 (29%)	7 (30%)	19 (30%)	0,9449	0,9397	0,8355
C	347 (85%)	238 (85%)	70 (85%)	39 (85%)	109 (85%)	-	-	-
T	61 (15%)	42 (15%)	12 (15%)	7 (15%)	19 (15%)	0,9248	0,8537	0,9136
rs17576 MMP9								
AA	96 (51%)	59 (48%)	24 (57%)	13 (59%)	37 (58%)	-	-	-
AG	79 (42%)	58 (47%)	13 (31%)	8 (36%)	21 (33%)	0,1782	0,464	0,1307
GG	12 (6%)	6 (5%)	5 (12%)	1 (5%)	6 (9%)	0,4421	0,7879	0,6515
AG+GG	91 (49%)	64 (52%)	18 (43%)	9 (41%)	27 (42%)	0,9545	0,8813	0,9186
A	271 (72%)	176 (72%)	61 (73%)	34 (77%)	95 (74%)	-	-	-
G	103 (28%)	70 (28%)	23 (27%)	10 (23%)	33 (26%)	0,9613	0,5486	0,6692
rs4898 TIMP1								
TT	85 (41%)	57 (41%)	23 (53%)	5 (22%)	28 (42%)	-	-	-
CT	62 (30%)	42 (30%)	10 (23%)	10 (43%)	20 (30%)	0,3037	0,1393	0,9276
CC	58 (28%)	40 (29%)	10 (23%)	8 (35%)	18 (27%)	0,3638	0,2765	0,9543
CT+CC	120 (59%)	82 (59%)	20 (47%)	18 (78%)	38 (58%)	0,2058	0,1261	0,9675
T	232 (56%)	156 (56%)	56 (65%)	20 (43%)	76 (58%)	-	-	-
C	178 (44%)	122 (44%)	30 (35%)	26 (57%)	56 (42%)	0,1687	0,1499	0,8314
rs7501477 TIMP2								
GG	130 (64%)	86 (62%)	29 (67%)	15 (65%)	44 (67%)	-	-	-
GT	63 (31%)	46 (33%)	11 (26%)	6 (26%)	17 (26%)	0,5008	0,7519	0,4258
TT	11 (5%)	6 (4%)	3 (7%)	2 (9%)	5 (8%)	0,8884	0,7984	0,6551
GT+TT	74 (36%)	52 (38%)	14 (33%)	8 (35%)	22 (33%)	0,6687	0,9735	0,6537
G	323 (79%)	218 (79%)	69 (80%)	36 (79%)	105 (80%)	-	-	-
T	85 (21%)	58 (21%)	17 (20%)	10 (21%)	27 (20%)	0,9229	0,9334	1

Falciforme p1= CVO <2 vs CVO 2 a 5; p2= CVO<2 vs CVO >5; p3= CVO<2 vs CVO ≥2. P valor= Fischer exact test.

Tabela 4 - Frequência dos SNPs dos genes *MMPs-TIMPs* nos pacientes com AF e risco para AVE.

rs1799750 MMP1, 1G/1G vs 1G/2G $p=0,0278$, OR=3,667 (1,249- 10,76). AR= pacientes com alto risco para AVE; Cond. = Pacientes condicionantes para AVE; P valor= Fischer exact test. DTC: Normal (menor que 170 cm/s); Condicionante (170-199 cm/s); alto risco (≥ 200 cm/s). p_1 = Normal vs cond; p_2 = Normal vs alto risco; p_3 = Normal vs Cond. + AR.

Tabela 5 - Frequência dos SNPs dos genes *MMPs-TIMPs* nos pacientes com AF e CVD.

rs1799750 MMP1	Total AF (n=200)	CVD+ (n=72)	CVD- (n=128)	p	OR	IC
1G/1G	58(29%)	24(33%)	34(27%)	-	-	-
1G/2G	95(48%)	31(43%)	64(50%)	0,3574	1,457	0,7411 - 2,866
2G/2G	47(24%)	17(24%)	30(23%)	0,7317	1,246	0,5642 - 2,750
1G/2G + 2G/2G	142(71%)	48(67%)	94(73%)	0,395	1,382	0,7378 - 2,590
1G	211(53%)	79(55%)	132(52%)	-	-	-
2G	189(47%)	65(45%)	124(48%)	0,5961	1,142	0,7579 - 1,720
rs2285053 MMP2	Total AF (n=204)	CVD+ (n=72)	CVD- (n=132)	p	OR	IC
CC	155(76%)	56(78%)	99(75%)			
CT	43(21%)	14(19%)	29(22%)	0,8002	1,172	0,5719 - 2,401
TT	6(3%)	2(3%)	4(3%)	0,7692	1,131	0,2007 - 6,376
CT+TT	49(24%)	16(22%)	33(25%)	0,7854	1,167	0,5903 - 2,306
C	353(87%)	126(88%)	227(86%)			
T	55(13%)	18(13%)	37(14%)	0,7821	1,141	0,6237 - 2,087
rs243865 MMP2	Total AF (n=205)	CVD+ (n=69)	CVD- (n=136)	p	OR	IC
CC	148(72%)	50(72%)	98(72%)			
CT	53(26%)	19(28%)	34(25%)	0,9178	0,913	0,4734 - 1,761
TT	4(2%)	0(0%)	4(3%)			
CT+TT	57(28%)	19(28%)	38(28%)	0,9173	1,02	0,5339 - 1,950
C	349(85%)	119(86%)	230(85%)			
T	61(15%)	19(14%)	42(15%)	0,7619	1,144	0,6369 - 2,054
rs17576 MMP9	Total AF (n=188)	CVD+ (n=69)	CVD- (n=119)	p	OR	IC
AA	96(51%)	39(57%)	57(48%)			
AG	80(43%)	24(35%)	56(47%)	0,1915	1,596	0,8517 - 2,992
GG	12(6%)	6(9%)	6(5%)	0,7562	0,6842	0,2055 - 2,278
AG+GG	90(48%)	28(41%)	62(52%)	0,231	1,515	0,8279 - 2,773
A	272(72%)	102(74%)	170(71%)			
G	104(28%)	36(26%)	68(29%)	0,6895	1,133	0,7063 - 1,818
rs4898 TIMP1	Total AF (n=206)	CVD+ (n=71)	CVD- (n=135)	p	OR	IC
TT	86(42%)	30(42%)	56(41%)			
CT	62(30%)	23(32%)	39(29%)	0,9177	0,9084	0,4602 - 1,793
CC	58(28%)	18(25%)	40(30%)	0,7639	1,19	0,5844 - 2,425
CT+CC	120(58%)	41(58%)	79(59%)	0,9666	1,032	0,5766 - 1,848
T	234(57%)	83(58%)	151(56%)			
C	178(43%)	59(42%)	119(44%)	0,6987	1,109	0,7348 - 1,673
rs7501477 TIMP2	Total AF (n=205)	CVD+ (n=72)	CVD- (n=133)	p	OR	IC
GG	130(63%)	45(63%)	85(64%)			
GT	64(31%)	22(31%)	42(32%)	0,8986	1,011	0,5383 - 1,898
TT	11(5%)	5(7%)	6(5%)	0,6941	0,6353	0,1837 - 2,197
GT+TT	75(37%)	27(38%)	48(36%)	0,9616	0,9412	0,5195 - 1,705
G	324(79%)	112(78%)	212(80%)			

T 86(21%) 32(22%) 54(20%) 0,7421 0,8915 0,5442 - 1,461
 AF= Anemia Falciforme; CVD+= histórico de cérebro-vascular disease; CVD- = sem histórico de cérebro-vascular disease; OR= Odds Ration; IC= Intervalo de confiança. P valor= Fischer exact test.

Tabela 6 - Frequência dos SNPs dos genes *MMPs-TIMPs* nos pacientes com AF e AVE.

rs1799750 MMP1	Total AF (n=244)	AVE+ (n=16)	AVE- (n=228)	p	OR	IC
1G/1G	72 (30%)	7 (44%)	65 (29%)	-	-	-
1G/2G	115 (47%)	7 (44%)	108 (47%)	0,5263	1,662	0,5574 - 4,953
2G/2G	57 (23%)	2 (12%)	55 (24%)	0,3041	2,962	0,5906 - 14,85
1G/2G + 2G/2G	172 (70%)	9 (56%)	163 (71%)	0,3132	1,95	0,6970 - 5,458
1G	259 (53%)	21 (66%)	238 (52%)	-	-	-
2G	229 (47%)	11 (34%)	218 (48%)	0,1976	1,749	0,8240 - 3,711
rs2285053 MMP2	Total AF (n=248)	AVE+ (n=16)	AVE- (n=232)	p	OR	IC
CC	182 (73%)	12 (75%)	170 (73%)	-	-	-
CT	60 (24%)	3 (19%)	57 (25%)	0,8924	1,341	0,3653 - 4,924
TT	6 (2%)	1 (6%)	5 (2%)	0,8893	0,3529	0,03810 - 3,269
CT+TT	66 (27%)	4 (25%)	62 (27%)	0,8875	1,094	0,3400 - 3,520
C	424 (85%)	27 (84%)	397 (86%)	-	-	-
T	72 (15%)	5 (16%)	67 (14%)	0,94	0,9113	0,3390 - 2,450
rs243865 MMP2	Total AF (n=251)	AVE+ (n=15)	AVE- (n=236)	p	OR	IC
CC	186 (74%)	14 (93%)	172 (73%)	-	-	-
CT	61 (24%)	1 (7%)	60 (25%)	0,1732	4,884	0,6284 - 37,95
TT	4 (2%)	0 (0%)	4 (2%)	-	-	-
CT+TT	65 (26%)	1 (7%)	64 (27%)	0,1472	5,209	0,6710 - 40,44
C	433 (86%)	29 (96%)	404 (86%)	-	-	-
T	69 (14%)	1 (3%)	68 (14%)	0,1514	4,881	0,6537 - 36,45
rs17576 MMP9	Total AF (n=211)	AVE+ (n=14)	AVE- (n=197)	p	OR	IC
AA	105 (50%)	9 (64%)	96 (49%)	-	-	-
AG	88 (42%)	5 (36%)	83 (42%)	0,6225	1,556	0,5016 - 4,829
GG	18 (9%)	0 (0%)	18 (9%)	-	-	-
AG+GG	106 (50%)	5 (36%)	101 (51%)	0,3964	1,894	0,6126 - 5,854
A	298 (71%)	23 (82%)	275 (70%)	-	-	-
G	124 (29%)	5 (18%)	119 (30%)	0,2416	1,991	0,7389 - 5,362
rs4898 TIMP1	Total AF (n=251)	AVE+ (n=15)	AVE- (n=236)	p	OR	IC
TT	103 (41%)	5 (33%)	98 (42%)	-	-	-
CT	70 (28%)	8 (53%)	62 (26%)	0,1881	0,3954	0,1237 - 1,264
CC	78 (31%)	2 (13%)	76 (32%)	0,6876	1,939	0,3659 - 10,27
CT+CC	148 (59%)	10 (67%)	138 (58%)	0,7228	0,7041	0,2333 - 2,125
T	276 (55%)	18 (60%)	258 (55%)	-	-	-
C	226 (45%)	12 (40%)	214 (45%)	0,7034	1,244	0,5861 - 2,641
rs7501477 TIMP2	Total AF (n=248)	AVE+ (n=16)	AVE- (n=232)	p	OR	IC
GG	153 (62%)	9 (56%)	144 (62%)	-	-	-
GT	83 (33%)	6 (38%)	77 (33%)	0,9001	0,8021	0,2752 - 2,338
TT	12 (5%)	1 (6%)	11 (5%)	0,7752	0,6875	0,07964 - 5,935
GT+TT	95 (38%)	7 (44%)	88 (38%)	0,8436	0,7857	0,2825 - 2,185
G	389 (78%)	24 (75%)	365 (79%)	-	-	-

T	107 (22%)	8 (25%)	99 (21%)	0,7909	0,8137	0,3546 - 1,867
---	-----------	---------	----------	--------	--------	----------------

AF= Anemia Falciforme; AVE+= pacientes com histórico de acidente vascular encefálico; AVE-= pacientes sem histórico de acidente vascular encefálico. OR= Odds Ratio; IC= Intervalo de confiança. P valor= Fischer exact test.

Na **tabela 7** está representado os valores do fold change da expressão gênica de cada grupo de casos em relação ao grupo controle normal. Esses dados mostram uma expressão gênica mais acentuado do *MMP1*, que se comparada aos demais, chegando a expressar até 3,32 vezes mais do que o grupo controle, (**tabela 7**).

Tabela 7 - Fold change do ensaio de expressão, análise por grupo.

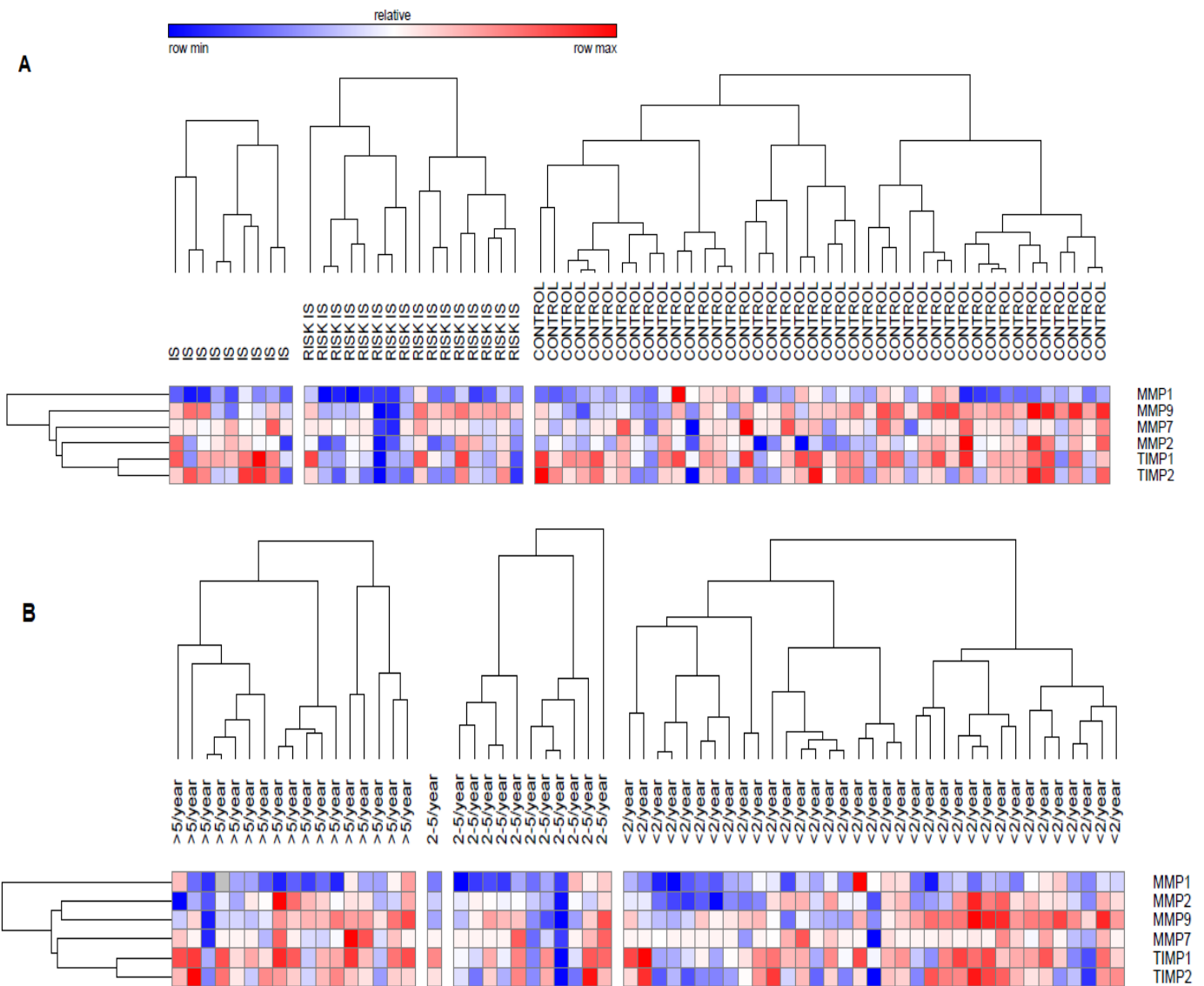
Eventos clínicos	FC <i>MMP1</i>	FC <i>MMP2</i>	FC <i>MMP7</i>	FC <i>MMP9</i>	FC <i>TIMP1</i>	FC <i>TIMP2</i>
AVE	2,23	0,83	0,70	1,49	0,76	0,72
DTC	3,25	1,45	1,57	1,36	1,71	1,32
CVO	1,53	0,96	0,94	2,00	0,90	0,94
CVD	3,32	1,54	1,40	2,02	1,52	1,33

FC= Fold change; AVE= Acidente vascular encefálico; DTC= Ultrassonografia doppler transcraniana; CVO= Crise vaso-oclusiva; CVD= Doença cerebrovascular.

Os níveis de expressão dos genes *MMP1*, *MMP2*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP1* e *TIMP2* foram mensurados por PCR quantitativa a partir do PBMC de pacientes com AF, homocigotos HbSS, com histórico ou risco de AVE e também em pacientes com histórico de CVO, comparado a pacientes sem a manifestação clínica/controle. Um panorama geral da expressão gênica está representado no Heatmap da **figura 15**.

Foram destacadas as diferenças nos níveis de expressão dos genes *MMPs-TIMPs* nos pacientes com AF e CVD e, dentre estes genes, o que apresentou diferença significativa na expressão foi o gene *MMP1*, com maiores níveis de expressão nos indivíduos com CVD, comparado aos pacientes controle, $p=0,0002$, (**Figura 16**).

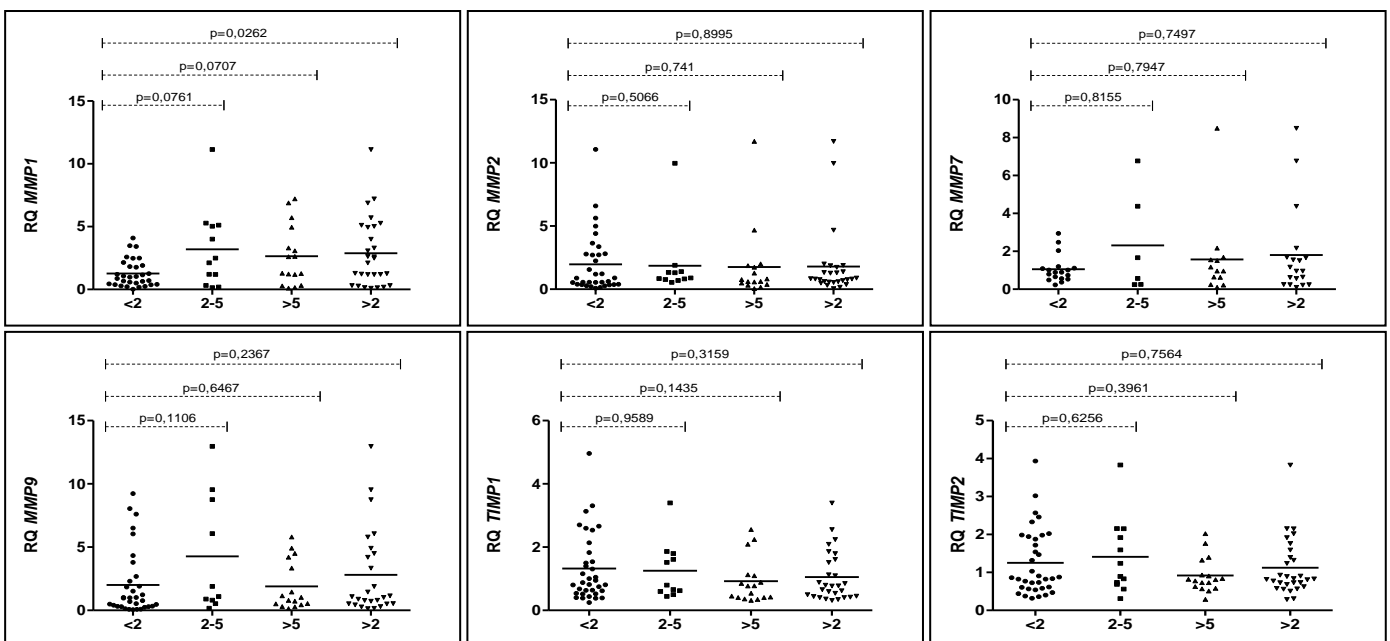
Figura 15 - Heatmap expressão gênica das MMPs-TIMPs em pacientes com anemia falciforme e doença cerebrovascular (figura A) e crise vaso-oclusiva (figura B). IS= Ischemic Stroke, Risk IS= Risco de Ischemic Stroke, Control= Indivíduos controles sem IS, >5/year= pacientes que apresentaram mais de 5 eventos vaso-oclusivos por ano, 2-5/year= pacientes que apresentaram de 2 a 5 eventos vaso-oclusivos por ano, <2/year= pacientes que apresentaram menos de 2 eventos vaso-oclusivos por ano, MMP1= Metaloproteinase 1, MMP2= Metaloproteinase 2, MMP7= Metaloproteinase 7, MMP9= Metaloproteinase 9, TIMP1= Inibidor tecidual endógeno de metaloproteinase 1, TIMP2= Inibidor tecidual endógeno de metaloproteinase 2. Row min= menor expressão de mRNA, Row max= maior expressão de metaloproteinase 2. Figura A= pacientes com doença cerebrovascular, Figura B= pacientes com crise vaso-oclusiva.



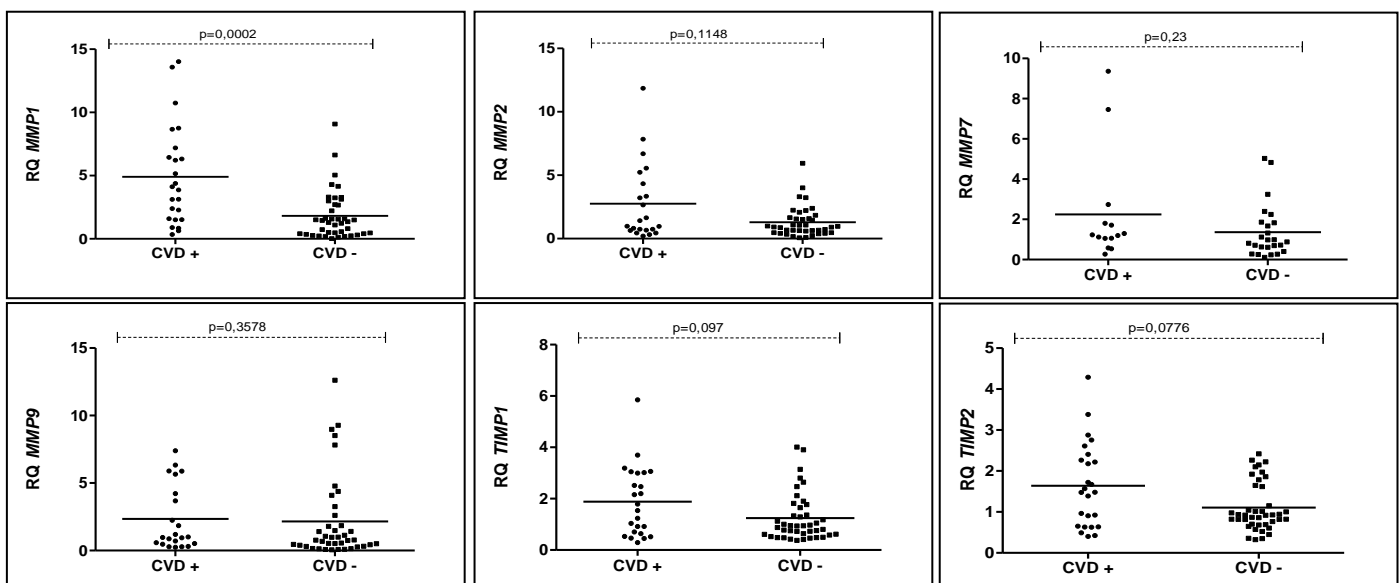
Fonte: O autor.

Figura 16 - Expressão gênica *MMPs-TIMPs* em indivíduos com crise vaso-oclusiva (fig A); doença cerebrovascular (fig B). Figura A= pacientes com crise vaso-oclusiva, Figura A= pacientes com doença cerebrovascular, >5/year= pacientes que apresentaram mais de 5 eventos vaso-oclusivos por ano, 2-5/year= pacientes que apresentaram de 2 a 5 eventos vaso-oclusivos por ano, <2/year= pacientes que apresentaram menos de 2 eventos vaso-oclusivos por ano, MMP1= Metaloproteinase 1, MMP2= Metaloproteinase 2, MMP7= Metaloproteinase 7, MMP9= Metaloproteinase 9, TIMP1= Inibidor tecidual endógeno de metaloproteinase 1, TIMP2= Inibidor tecidual endógeno de metaloproteinase 2, CVD+ = pacientes com doença cerebrovascular, CVD- = pacientes sem doença cerebrovascular, RQ= relative quantification. Teste estatístico= kruskal wallis ou mann Whitney. $p < 0,05$.

A



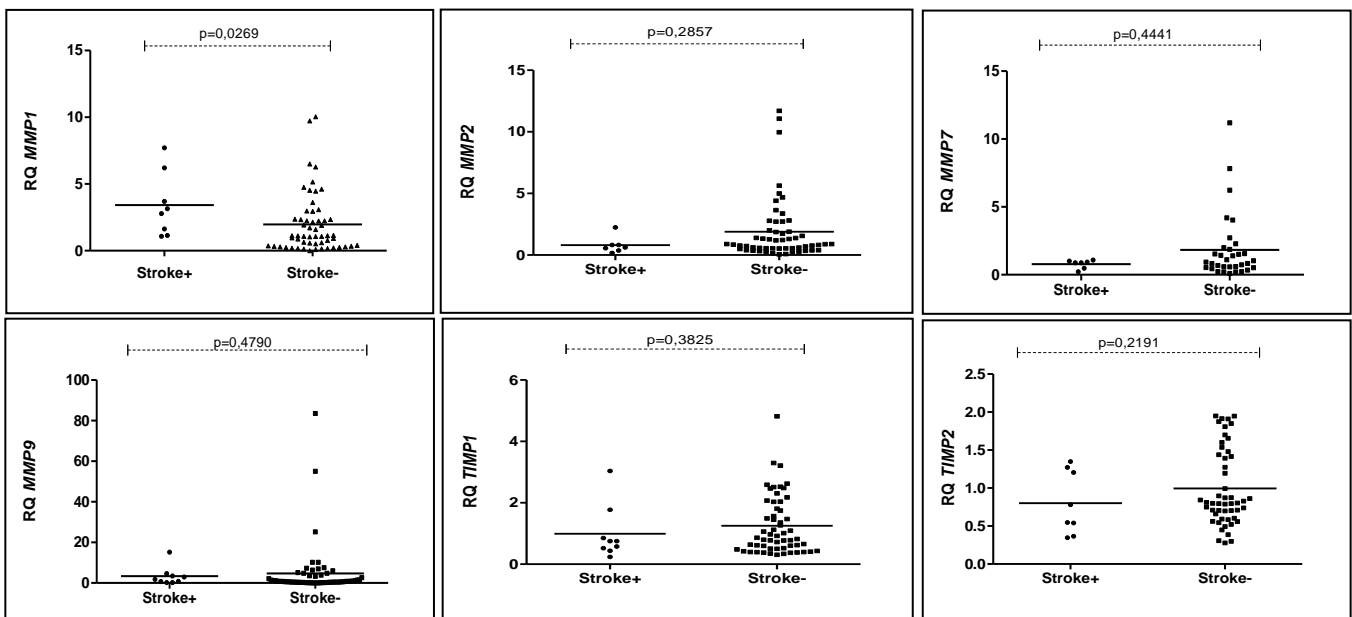
B



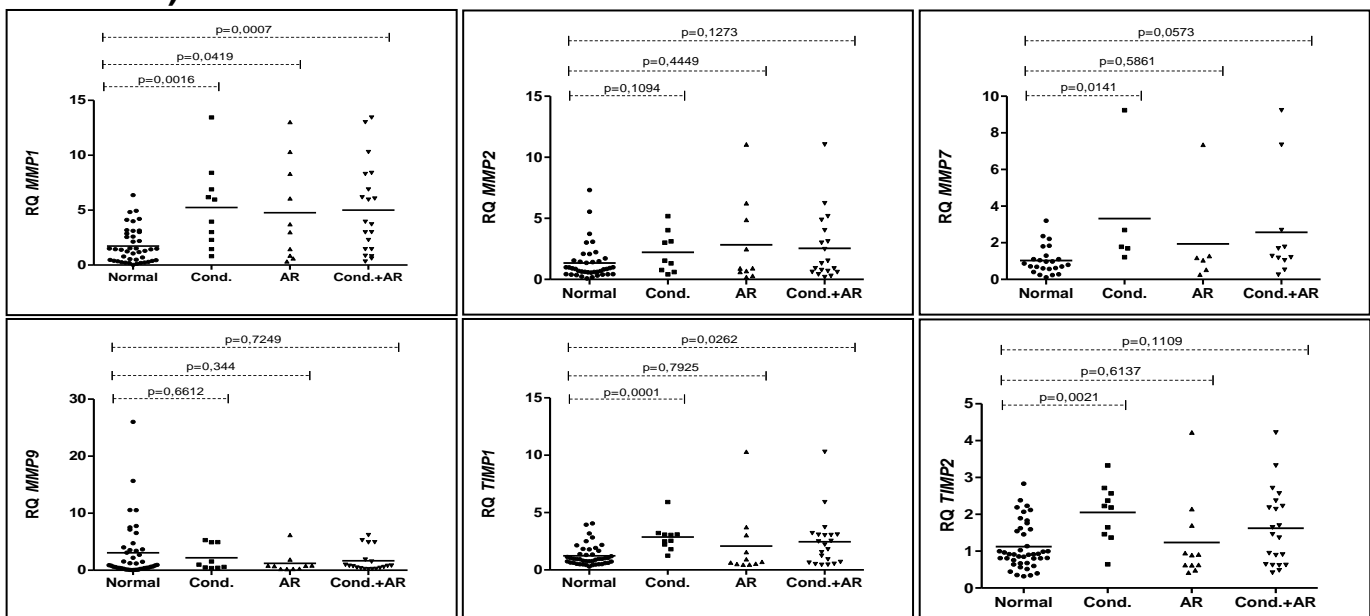
Ao avaliar apenas os pacientes com histórico de IS, comparados aos pacientes sem IS, o gene *MMP1* apresentou maior expressão nos pacientes com histórico IS, $p=0,0269$ (Figura 17).

Figura 17 - Expressão gênica *MMPs-TIMPs* em indivíduos com histórico de Acidente Vascular Encefálico (figura A) e risco aumentado para ischemic stroke, avaliado pelo DTC (Figura B). Figura A= pacientes com stroke, Figura B AR= pacientes com alto risco para IS; Cond. = Pacientes condicionantes para IS; P valor= Fischer exact test. DTC: Normal (menor que 170 cm/s); Condicionante (170-199 cm/s); alto risco (≥ 200 cm/s), *MMP1*= Metaloproteinase 1, *MMP2*= Metaloproteinase 2, *MMP7*= Metaloproteinase 7, *MMP9*= Metaloproteinase 9, *TIMP1*= Inibidor tecidual endógeno de metaloproteinase 1, *TIMP2*= Inibidor tecidual endógeno de metaloproteinase 2. RQ= relative quantification. Teste estatístico= kruskal wallis ou mann Whitney. $p<0,05$.

A)



B)



Os níveis de expressão dos genes *MMPs-TIMPs* também foram mensurados nos pacientes com risco de desenvolvimento de AVE. O gene *MMP1* foi mais expresso nos grupos de pacientes condicionantes para AVE, $p=0,0016$, também teve maior expressão nos pacientes com alto risco para AVE, $p=0,0419$. Os genes *MMP7* e *TIMP1* e *TIMP2* também estiveram mais expressos nos pacientes com risco para AVE, $p=0,0141$ e $p=0,0262$, $p=0,0021$, respectivamente (**Figura 17**). Os genes *MMP2* e *MMP9* não apresentaram diferenças significativas nos níveis de expressão nestes grupos.

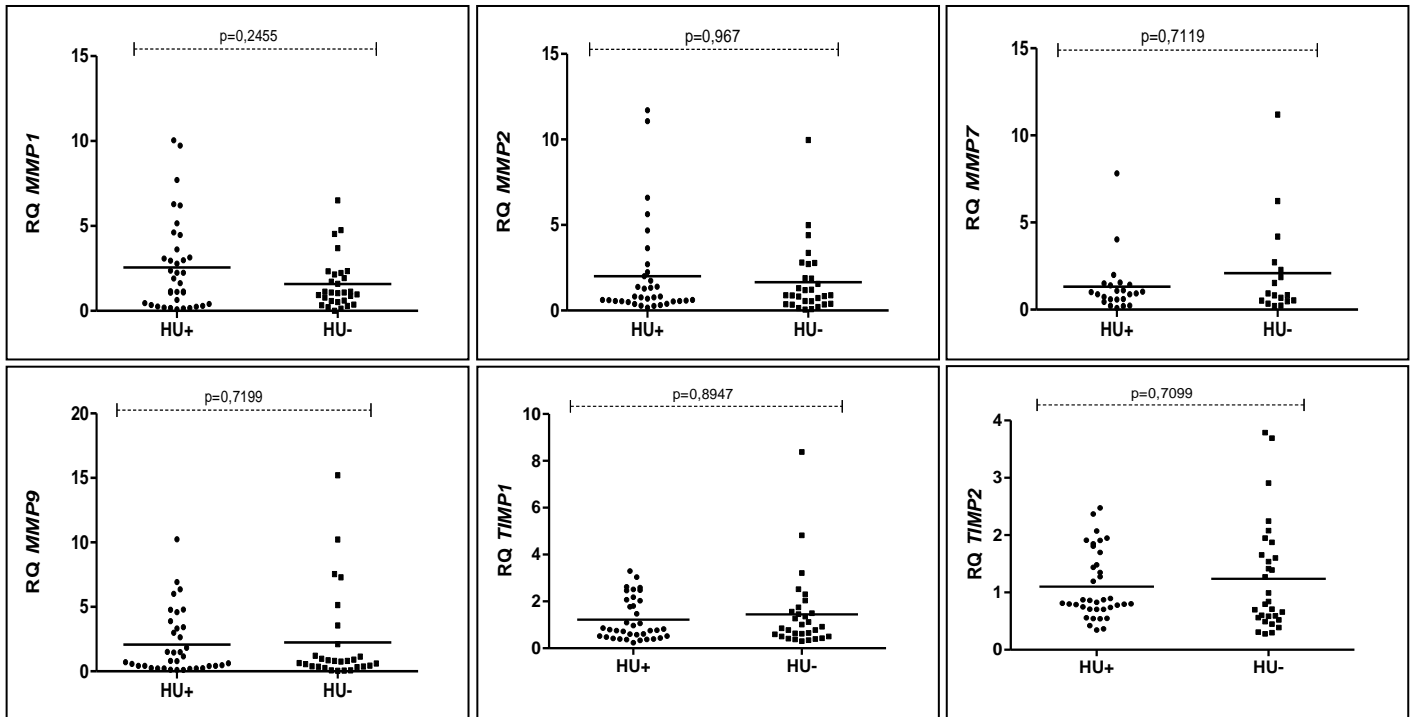
Nos pacientes com histórico de CVO, apenas o gene *MMP1* teve sua expressão aumentada de forma significativa nos pacientes com ≥ 2 CVO/ano, comparado aos pacientes com < 2 eventos/ano, $p=0,0262$, (**Figura 16**). Os demais genes de *MMPs-TIMPs* não foram associados a CVO nos grupos estudados (**Figura 16**).

Também avaliamos a expressão das *MMPs-TIMPs* entre os grupos de pacientes que utilizam HU comparado aos que não fazem uso, com o intuito de analisar se a HU interfere nos níveis de expressão desses genes, porém não foi observado associação da expressão destes genes com HU (**Figura 18**).

Foi avaliado os níveis de expressão gênica entre os genótipos de cada SNP deste trabalho. Apenas o SNP rs17576 do *MMP9* apresentou diferenças significativas da expressão genica entre os genótipos, onde o genótipo AG, $p=0,0135$, e AG+GG, $p=0,0065$, apresentaram níveis mais elevados de expressão quando comparado ao genótipo AA (**Figura 19**). Os demais genes não apresentaram relação dos genótipos com a expressão do gene. O estudo da correlação entre as *MMPs* e *TIMPs* não mostrou relação entre estes genes nos pacientes desta pesquisa (**Figura 18**).

Figura 18 - Expressão gênica *MMPs-TIMPs* em relação ao uso de HU (figura A) e correlação dos genes *MMPs-TIMPs* (Figura B). Figura A= pacientes que fazem uso de Hidroxiuréia, Figura B= correlação das *MMPs* com *TIMPs*, HU= hidroxiuréia, MMP1= Metaloproteinase 1, MMP2= Metaloproteinase 2, MMP7= Metaloproteinase 7, MMP9= Metaloproteinase 9, TIMP1= Inibidor tecidual endógeno de metaloproteinase 1, TIMP2= Inibidor tecidual endógeno de metaloproteinase 2. RQ= relative quantification. Teste estatístico= Mann Whitney, $p < 0,05$. Teste correlação de spearman.

A)



B)

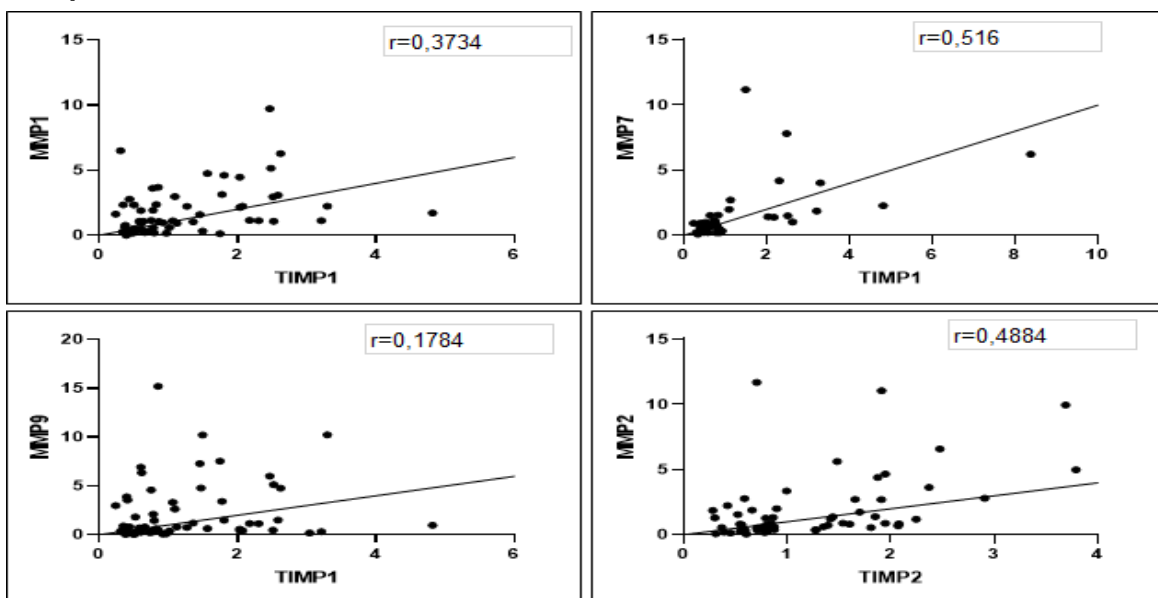
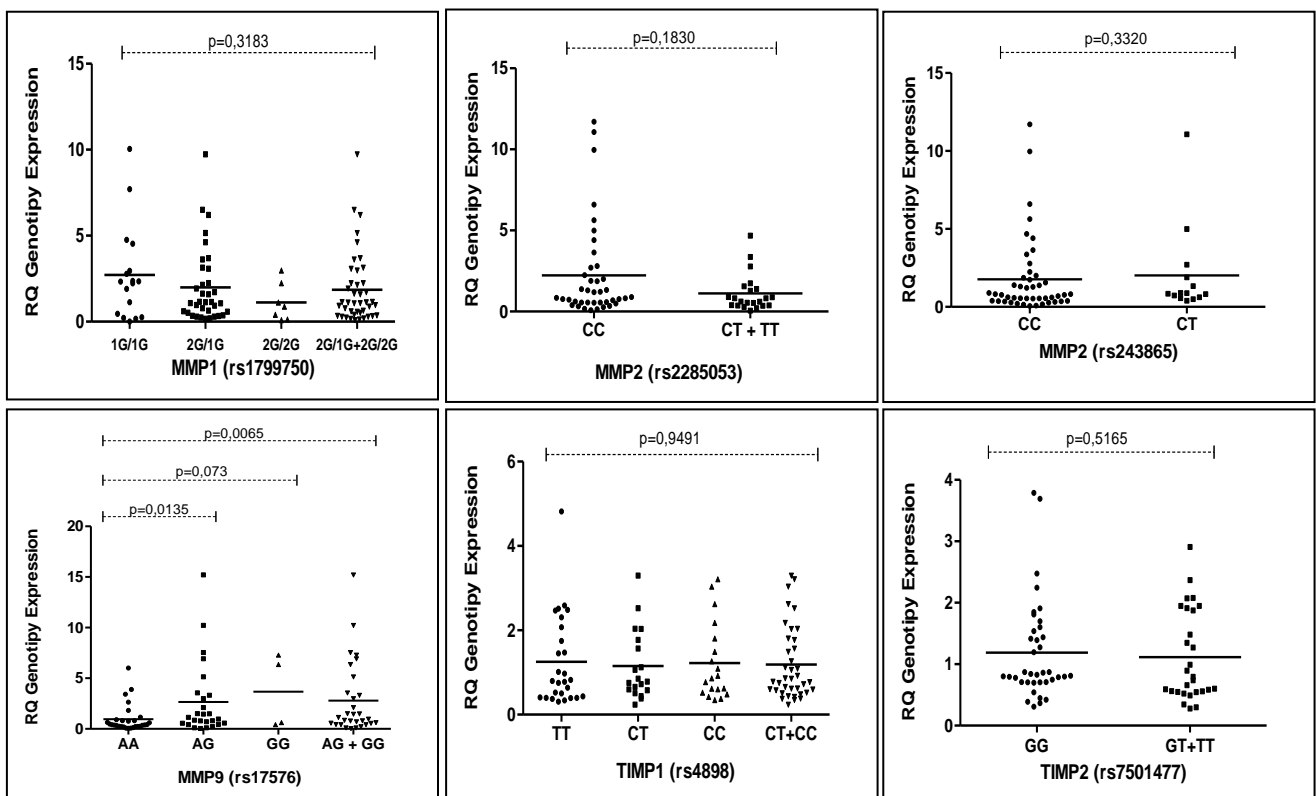


Figura 19 - Expressão gênica das *MMPs-TIMPs* em relação aos SNPs. MMP1= Metaloproteinase 1, MMP2= Metaloproteinase 2, MMP7= Metaloproteinase 7, MMP9= Metaloproteinase 9, TIMP1= Inibidor tecidual endógeno de metaloproteinase 1, TIMP2= Inibidor tecidual endógeno de metaloproteinase 2. MMP1 1G= major alele, MMP1 2G= minor alele, MMP2 C= major alele, MMP2 T= minor alele, MMP9 A= major alele, MMP9 G= minor alele, TIMP1 T= Major alele, TIMP1 C= minor alele, TIMP2 G= major alele, TIMP2 T= minor alele. RQ= quantificação Relativa. Teste estatístico= kruskal wallis ou mann Whitney. $p < 0,05$.



6 DISCUSSÃO

Para o nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo a avaliar SNPs e expressão dos genes das MMPs e seus inibidores TIMPs em pacientes jovens com AF e manifestações cerebrovasculares e vaso-oclusivas.

Os níveis de expressão do gene *MMP1* foram maiores nos pacientes com CVD, histórico de AVE, pacientes com alterações no DTC e indivíduos com ≥ 2 eventos CVO/ano, comparado aos pacientes sem estas manifestações. Corroborando com o estudo em células formadoras de colônias endoteliais (ECFCs) presentes no sangue periférico, em que o estudo de expressão diferencial apontou superexpressão do gene *MMP1* em ECFCs de adultos com AF e AVE (ITO *et al.*, 2020). A hipótese funcional na *MMP1* na AF envolve o processo de angiogênese, evento importante na AF, que pode ser regulado pela *MMP1*, pois há relatos de que a angiogênese contribua para o reparo neurológico envolvendo a remodelação da matriz extracelular (ITO *et al.*, 2020; HERMANN; ZECHARIAH, 2009; RUNDHAUG, 2005). Secretada por macrófagos, a *MMP1* faz com que estas células penetrem nos tecidos lesionados durante o processo inflamatório, digerindo elastina e degradando a membrana basal (ZHANG *et al.*, 2018). Na literatura, já existem relatos da atuação dessa molécula também em doenças inflamatórias (ITO *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2017), por exemplo, no AVE aterosclerótico, ela atua na migração de células musculares lisas vasculares, diferenciação de monócitos e degradação do colágeno tipos I, II e III (WESLEY *et al.*, 1998; ROCNIK *et al.*, 1998; NIKKARI *et al.*, 1995), como a inflamação crônica é um evento chave na AF, indicamos estudos que correlacionem a *MMP1* com marcadores inflamatórios na AF. Além disso, acreditamos que altos níveis de *MMP1* pode estar associado a degradação excessiva da matriz extracelular e manutenção da inflamação crônica, que seria prejudicial para os pacientes com AF.

Cerca de 90% dos AVE podem ser evitados com a terapia de transfusão de sangue preventiva em pacientes com alto fluxo detectado pelo DTC, porém o risco de AVE reaparece quando o regime de transfusão é interrompido (ADAMS *et al.*, 1998; PLATT, 2006). Além disso, com a aumento da idade dos pacientes, à medida que o crânio amadurece, fica mais difícil a triagem pelo DTC, assim, a descoberta de outros fatores de risco que complementem o DTC se fazem necessários, pois pode oferecer uma chance de prevenção do AVE complementar ao DTC (PLATT, 2006), e neste estudo, a *MMP1* se mostou como uma molécula promissora para esta finalidade.

Observamos que o genótipo 1G/1G esteve mais frequente nos pacientes de alto risco para AVE comparado ao genótipo 1G/2G, $p=0,0278$, $OR=3,667$ (1,249-10,76). Porém, esses achados ainda são muito preliminares e necessitam de novos estudos para confirmar e entender o efeito desse SNP sobre a doença. Não encontramos associação entre o SNP e os níveis de expressão de MMP1, mas já foi visto que em células de fibroblastos, melanoma, e endoteliais da veia umbilical humana, a presença do alelo 2G está associado a níveis mais elevados de MMP1 (AFFARA *et al.*, 2011; RUTTER *et al.*, 1998). Além do SNP, outros fatores podem regular os níveis de expressão do gene, como RNAs circulantes, miRNAs, outras proteases, citocinas, ligantes de superfície celular e fatores de crescimento (ROY, 2019; LIU *et al.*, 2021; BODE *et al.*, 1999), e este pode ser um dos motivos pelo qual não foi observada relação do SNP com a expressão do gene neste estudo.

A expressão gênica de *MMP7* também foi aumentada em pacientes com risco de desenvolvimento de cerebral AVE. Em indivíduos com câncer, de acordo com estudo no The Cancer Genome Atlas (TCGA), seus níveis foram significativamente aumentados em diversos tipos de cânceres (MENG *et al.*, 2022). No câncer, o papel dessa molécula está ligado a degradação de caseína, fibronectina, colágeno e proteoglicanos, desempenhando influência na gênese e desenvolvimento de tumores, redução da adesão celular, inibição da apoptose e promovendo a vasculogênese (MENG *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2006). Em idosos, na Suécia, os níveis circulantes de *MMP7* foram associados de forma independente ao AVE, apontando assim esta molécula como fator de risco e um possível marcador para cerebral AVE (LIND *et al.*, 2015). Apesar de haver poucos estudos relacionados a esta MMP, sua participação na regulação da matriz extracelular e inflamação pode ser importante no AVE de indivíduos com AF, pois em pacientes com doença cardiovascular, foi observado que os níveis de *MMP7* foram aumentados comparado a indivíduos controle, e que a *MMP7* pode ativar a pró-*MMP8* em *MMP8*, principalmente no processo inflamatório da doença cardiovascular (TOUMAINEN *et al.*, 2014).

Neste estudo, o SNP rs17576 do *MMP9* apresentou diferenças significativas na expressão gênica entre os genótipos, cujo genótipo AG, $p=0,0135$, e AG+GG, $p=0,0065$, apresentaram níveis mais elevados de expressão do gene *MMP9* quando comparado ao genótipo AA. Na literatura, não foi encontrado estudos anteriores que revelassem associação deste SNP com os níveis de expressão do gene *MMP9*. No entanto, já foi observado que o alelo variante G está associado a níveis aumentados

de MMP9 no plasma de pacientes com doença cardiovascular (LUIZON *et al.*, 2016; BLANKENBERG *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 1999).

Zielińska-Turek *et al.* (2022) observaram níveis aumentados de MMP9 em pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico em comparação a pacientes com estenose carótida assintomática. Cai *et al.* (2022), em seus estudos com ratos machos Sprague-Dawley submetidos ao modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO), visualizou que níveis de expressão de MMP9 foram significativamente maiores nesses animais. Estes autores ainda sugeriram que a inibição da MMP9 pode proteger a integridade da barreira hematoencefálica, preservando as proteínas de junção na lesão cerebral isquêmica. Com isso, a relação desta molécula na doença cerebral se dá ao fato de a MMP9 atuar sobre o colágeno tipo IV, fibronectina e laminina, principais componentes da lâmina basal, exercendo influência sobre a abertura tardia da barreira hematoencefálica após lesão cerebral isquêmica (LAKHAN *et al.*, 2013). Assim, não descartamos a importância de novos estudos que envolvam esta MMP e seu potencial como marcador e até mesmo alvo terapêutico para AF.

Neste estudo, apenas o SNP 372 T > C (Phe124Phe; rs4898) *TIMP1* apresentou uma distribuição da frequência alélica de T mais elevada no grupo de pacientes com CVO>5 eventos/ano, comparado ao grupo controle com menos de 2 eventos/ano, com OR= 1,757 (1,042 - 2,962), ($p= 0,0452$), sendo este o primeiro estudo a avaliar este SNP em indivíduos com AF. A CVO é um dos eventos responsáveis pelo desencadeamento da maioria dos sinais e sintomas nos pacientes com AF, inclusive o cerebral AVE (KOSARAJU *et al.*, 2017). Porém, os efeitos deste SNP sobre a expressão do gene *TIMP1* são desconhecidos, e não encontramos relação do SNP com a expressão gênica de *TIMP1*.

Ainda observamos que o gene *TIMP1* foi mais expresso nos pacientes com risco para AVE, $p=0,0262$. Em pacientes com AVE e estenose $\geq 70\%$, os níveis de *TIMP1* foram maiores do que em pacientes após endarterectomia, apontando que este pode ser um bom fator preditivo para AVE (ZIELIŃSKA-TUREK *et al.*, 2022). A função da *TIMP1* na doença cerebral está relacionada com a inibição da atividade de MMP9 (SU *et al.*, 2019). SU *et al.*, (2019), em seu estudo com ratos, a injeção de *TIMP1* humana recombinante (rhTIMP-1, 1,60 $\mu\text{g}/\text{kg}/36\text{ h}$) diminuiu a expressão e ativação de MMP9 no córtex, e, com isso, ocorreu a diminuição de AVE, indicando que a inibição direta da ativação de MMP-9, via rhTIMP1 exógeno, exerce um efeito neuroprotetor contra acidente vascular cerebral em ratos induzido pelo frio, aliviando

o desequilíbrio entre MMP-9 e TIMP-1 (SU *et al.*, 2019). A injeção intravenosa de nanopartículas de TIMP1 (CHATURVEDI *et al.*, 2014), plasmídeos de cDNA de TIMP1 injetados intracerebroventricular (CHEN *et al.*, 2013), ajudaram a manter a integridade da barreira hematoencefálica, por aumentar os níveis de TIMP1 no sistema nervoso central. Como vimos, associação da expressão do gene TIMP1 com risco de AVE neste estudo, incentivamos estudos intervencionais como os que foram citados acima, pois podem reduzir a incidência de AVE na AF.

Neste estudo o gene *TIMP2* também esteve mais expresso nos pacientes condicionantes para cerebral AVE, $p=0,0021$. Na hipertensão arterial resistente, os níveis de TIMP2 no plasma também foram aumentados sugerindo atividade desequilibrada de MMP2 na hipertensão (SABBATINI *et al.*, 2016). Nas doenças cerebrovasculares, de acordo com a literatura atual, o desequilíbrio entre TIMP2 e MMP2 foi relacionado ao remodelamento e disfunção vascular (CASTRO *et al.*, 2008), transformação hemorrágica após isquemia cerebral (LORENZL *et al.*, 2003), aneurisma cerebral (AOKI *et al.*, 2007) e ruptura da barreira hematoencefálica (KRIZANAC-BENGEZ *et al.*, 2006). Este foi o primeiro estudo a fornecer informações sobre o SNP e expressão do gene TIMP2 no cerebral AVE em AF, e indicamos novos estudos para melhor esclarecer seu papel na doença.

Algumas limitações podem ser apontadas neste estudo, como o pequeno número de pacientes, o que prejudica um pouco as análises estatísticas, pois as medidas de lockdown contra a Covid-19 no Brasil interromperam as coletas de amostra biológica, interferindo na quantidade de pacientes coletados. Pelo estudo ser composto por pacientes jovens, o número de casos foi bastante reduzido em comparação aos controles e outro estudo abordando pacientes adultos pode trazer novas conclusões acerca deste tema, o qual também permitiria uma análise mais prolongada da relação entre as MMPs-TIMPs e as sequelas deixadas após o cerebral AVE.

As diferenças nos resultados ou ausência de associação com alguns dos genes pode ser devida a diferenças étnicas, tamanho da população, desenho do estudo e também muito importante fatores epigenéticos. Por fim, recomendamos novo estudo incluindo estudos experimentais com genes nocautes para as MMPs-TIMPs.

Por fim, os pacientes com histórico de cerebral AVE não apresentaram padrões de expressão visíveis no Heatmap. Nossa hipótese é que com a cura do evento de AVE a expressão das MMPs-TIMPs retorna as condições normais. Já os pacientes

com risco para AVE apresentam padrões de expressão up-regulated. Os indivíduos controles, em sua maioria, estão relacionados a menor expressão. Nos indivíduos com CVO apenas o gene *MMP1* apresenta um padrão de maior expressão genica nos grupos com ≥ 2 CVO/ano em comparação aos indivíduos com < 2 CVO/ano.

6.2 CONCLUSÕES

O gene *MMP1* tanto o SNP *MMP1* -1607 1G/2G quanto os níveis de expressão foram associados ao risco de cerebral IS, a expressão do *MMP1* também foi associada a maior frequência de CVO/ano. Os níveis de expressão de *MMP7*, *TIMP1* e *TIMP2* estiveram aumentados em pacientes condicionantes a cerebral IS. O SNP 372T>C (rs4898) *TIMP1* alelo T foi mais frequente em pacientes com > 5 eventos CVO/ano. O SNP rs17576 do *MMP9* apresentou diferenças nos níveis de expressão do gene, estando aumentados nos genótipos AG, e AG+GG. Os achados desse estudo, os SNPs e expressão gênica dão suporte inicial para um entendimento do papel das MMPs-TIMPs na fisiopatologia da AF em pacientes jovens e as indicando como potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADABI, Z. *et al.* Genetic Polymorphism of MMP2 Gene and Susceptibility to Prostate Cancer. Archives of Medical Research, v. 46, n. 7, p. 546–550, 1 out. 2015.
- ADEKILE, A. *et al.* The influence of uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A promoter polymorphisms, betaS-globin gene haplotype, co-inherited alpha-thalassemia trait and Hb F on steady-state serum bilirubin levels in sickle cell anemia. European Journal of Haematology, v. 75, n. 2, p. 150–155, ago. 2005.
- ALP, E. *et al.* The Role of Matrix Metalloproteinase-2 Promoter Polymorphisms in Coronary Artery Disease and Myocardial Infarction. Genetic Testing and Molecular Biomarkers, v. 15, n. 4, p. 193–202, abr. 2011.
- AMĂLINEI, C. *et al.* Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie, v. 51, n. 2, p. 215–228, 2010.
- ARAGÃO, Matheus Todt. Diferenças microbiológicas entre úlceras falcêmicas e não falcêmicas. 2015. Dissertação. universidade federal de sergipe pró-reitoria de pós-graduação e pesquisa núcleo de pós-graduação e pesquisa em ciências da saúde. Aracaju 2015.
- ARPINO, V.; BROCK, M.; GILL, S. E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. Matrix Biology, v. 44-46, p. 247–254, 1 maio 2015.
- AZEVEDO, E. Historical note on inheritance of sickle cell anemia. American Journal of Human Genetics, v. 25, n. 4, p. 457–458, 1 jul. 1973.
- BAE, H. T. *et al.* Meta-analysis of 2040 sickle cell anemia patients: BCL11A and HBS1L-MYB are the major modifiers of HbF in African Americans. Blood, v. 120, n. 9, p. 1961–1962, 30 ago. 2012.
- BARILLARI, G. The Impact of Matrix Metalloproteinase-9 on the Sequential Steps of the Metastatic Process. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 12, p. 4526, 25 jun. 2020.
- BAUTERS, D. *et al.* Gelatinase A (MMP-2) promotes murine adipogenesis. Biochimica Et Biophysica Acta, v. 1850, n. 7, p. 1449–1456, 1 jul. 2015.
- BAZUAYE, G. N.; NWANNADI, A. I.; OLAYEMI, E. E. Leg ulcers in adult sickle cell disease patients in Benin City Nigeria. ugspace.ug.edu.gh, 2010.

BERNAUDIN, F. *et al.* Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. Blood, v. 117, n. 4, p. 1130–1140, 27 jan. 2011.

BIANCHI, N. *et al.* Increase of microRNA-210, Decrease of Raptor Gene Expression and Alteration of Mammalian Target of Rapamycin Regulated Proteins following Mithramycin Treatment of Human Erythroid Cells. PLOS ONE, v. 10, n. 4, p. e0121567, 7 abr. 2015.

BIANCHI, N. *et al.* Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of γ -globin gene expression. BMB Reports, v. 42, n. 8, p. 493–499, 31 ago. 2009.

BLACK, R. A. *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. Nature, v. 385, n. 6618, p. 729–33, 1997.

BODE, W. *et al.* Insights into MMP-TIMP interactions. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 878, p. 73–91, 30 jun. 1999.

BODE, W. *et al.* Insights into MMP-TIMP interactions. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 878, p. 73–91, 30 jun. 1999.

BRAGA, J.; APARECIDA, J.; BRAGA, P. Medidas gerais no tratamento das doenças falciformes General measures in the treatment of sickle cell disease. Rev. bras. hematol. hemoter, v. 29, n. 3, p. 233–238, 2007.

BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, v. 1477, n. 1-2, p. 267–283, mar. 2000.

BROUSSE, V.; BUFFET, P.; REES, D. The spleen and sickle cell disease: the sick(led) spleen. British Journal of Haematology, v. 166, n. 2, p. 165–176, 26 maio 2014.

BUNN, H. F. Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. New England Journal of Medicine, v. 337, n. 11, p. 762–769, 11 set. 1997.

CABRAL-PACHECO, G. A. *et al.* The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 24, p. 9739, 20 dez. 2020.

Cançado, R.D. Doenças Falciformes. Prática Hospitalar, v. 9, n. 50, p. 61-64. 2007.

CHALCHAL, H. *et al.* Impaired venous hemodynamics in a minority of patients with chronic leg ulcers due to sickle cell anemia. VASA. Zeitschrift für Gefasskrankheiten, v. 30, n. 4, p. 277–279, 1 nov. 2001.

CHEN, G. *et al.* Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. Blood, v. 123, n. 24, p. 3818–3827, 12 jun. 2014.

CHEN, S.-Y. *et al.* The Genomic Analysis of Erythrocyte microRNA Expression in Sickle Cell Diseases. PLoS ONE, v. 3, n. 6, p. e2360, 4 jun. 2008.

CHEN, Y.-J. *et al.* Gallic acid-capped gold nanoparticles inhibit EGF-induced MMP-9 expression through suppression of p300 stabilization and NFκB/c-Jun activation in breast cancer MDA-MB-231 cells. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 310, p. 98–107, 1 nov. 2016.

CHOU, S. T. Transfusion therapy for sickle cell disease: a balancing act. Hematology, v. 2013, n. 1, p. 439–446, 6 dez. 2013.

COLLA, J. S. *et al.* Bedside ultrasound as a predictive tool for acute chest syndrome in sickle cell patients. The American Journal of Emergency Medicine, v. 36, n. 10, p. 1855–1861, out. 2018.

DA CUNHA GOMES, E. G. *et al.* The erythrocyte alloimmunisation in patients with sickle cell anaemia: a systematic review. Transfusion Medicine, v. 29, n. 3, p. 149–161, 29 maio 2018.

DAS, S. S.; SINHA, R.; CHAKRAVORTY, N. Integrative microRNA and gene expression analysis identifies new drug repurposing candidates for fetal hemoglobin induction in β-hemoglobinopathies. Gene, v. 706, p. 77–83, jul. 2019.

DA SILVA JUNIOR, G. B.; DAHER, E. D. F.; DA ROCHA, F. A. C. Osteoarticular involvement in sickle cell disease. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 34, n. 2, p. 156–164, 2012.

DEBAUN, M. R. *et al.* Controlled Trial of Transfusions for Silent Cerebral Infarcts in Sickle Cell Anemia. New England Journal of Medicine, v. 371, n. 8, p. 699–710, 21 ago. 2014.

DAY, M. E.; RODEGHIER, M.; DEBAUN, M. R. Children with HbSβ0 thalassemia have higher hemoglobin levels and lower incidence rate of acute chest syndrome compared to children with HbSS. Pediatric Blood & Cancer, v. 65, n. 11, p. e27352, 1 nov. 2018.

DIAS, Ana Luísa De Araújo. A (re)construção do caminhar: itinerário terapêutico de pessoas com doença falciforme com histórico de úlcera de perna. 2013. Dissertação. Universidade federal da bahia instituto de saúde coletiva programa de pós-graduação em saúde coletiva mestrado em saúde coletiva. 2013.

DING, X.-W. *et al.* Propofol attenuates TNF- α -induced MMP-9 expression in human cerebral microvascular endothelial cells by inhibiting Ca²⁺/CAMK II/ERK/NF- κ B signaling pathway. Acta Pharmacologica Sinica, v. 40, n. 10, p. 1303–1313, 1 out. 2019.

DU, E. *et al.* Kinetics of sickle cell biorheology and implications for painful vasoocclusive crisis. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 112, n. 5, p. 1422–1427, 20 jan. 2015.

DU, M. *et al.* Effects of IL-1 β on MMP-9 Expression in Cementoblast-Derived Cell Line and MMP-Mediated Degradation of Type I Collagen. Inflammation, v. 42, n. 2, p. 413–425, 1 abr. 2019.

EDELSTEIN, C. L. Biomarkers in acute kidney injury. Biomarkers of Kidney Disease. Academic Press, p. 241-315. 2017.

ESTCOURT, L. J. *et al.* Interventions for preventing silent cerebral infarcts in people with sickle cell disease. Cochrane Database of Systematic Reviews, 13 maio 2017.

ESTCOURT, L. J. *et al.* Blood transfusion for preventing primary and secondary stroke in people with sickle cell disease. Cochrane Database of Systematic Reviews, v. 2020, n. 7, 27 jul. 2020.

FELIX, A. A.; SOUZA, H. M.; RIBEIRO, S. B. F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 32, p. 203–208, 2010.

FERRAZ, M. H. C.; MURAO, M. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 29, n. 3, set. 2007.

FLINT, J. *et al.* 1 The population genetics of the haemoglobinopathies. Baillière's Clinical Haematology, v. 11, n. 1, p. 1–51, 1 mar. 1998.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. Journal of Clinical Investigation, v. 117, n. 4, p. 850–858, 2 abr. 2007.

FRIEND, A.; GIRZADAS, D. Acute Chest Syndrome. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441872/>>.

GILL, F. M. *et al.* Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Blood, v. 86, n. 2, p. 776–783, 15 jul. 1995.

GOLDSTEIN, J.; KONIGSBERG, W.; HILL, R. J. The structure of human hemoglobin. VI. The sequence of amino acids in the tryptic peptides of the beta chain. The Journal of Biological Chemistry, v. 238, p. 2016–2027, 1 jun. 1963.

GORDEUK, V. R.; CASTRO, O. L.; MACHADO, R. F. Pathophysiology and treatment of pulmonary hypertension in sickle cell disease. Blood, v. 127, n. 7, p. 820–828, 18 fev. 2016.

GRZELA, K. *et al.* Airway Remodeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma: the Role of Matrix Metalloproteinase-9. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, v. 64, n. 1, p. 47–55, 28 jun. 2015.

HASSELL, K. L. Population Estimates of Sickle Cell Disease in the U.S. American Journal of Preventive Medicine, v. 38, n. 4, p. S512–S521, abr. 2010.

HEBBEL, R. P. Reconstructing sickle cell disease: A data-based analysis of the “hyperhemolysis paradigm” for pulmonary hypertension from the perspective of evidence-based medicine. American Journal of Hematology, v. 86, n. 2, p. 123–154, 21 jan. 2011.

HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. The Yale journal of biology and medicine, v. 74, n. 3, p. 179–84, 2001.

HEO, S. H. *et al.* Plaque Rupture is a Determinant of Vascular Events in Carotid Artery Atherosclerotic Disease: Involvement of Matrix Metalloproteinases 2 and 9. Journal of Clinical Neurology, v. 7, n. 2, p. 69, 2011.

HIDALGO, A. *et al.* Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. Nature Medicine, v. 15, n. 4, p. 384–391, 22 mar. 2009.

HIGGS, D. R.; WOOD, W. G. Genetic complexity in sickle cell disease. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 105, n. 33, p. 11595–11596, 11 ago. 2008.

HIRUMA, H. *et al.* Sickle cell rheology is determined by polymer fraction--not cell morphology. American Journal of Hematology, v. 48, n. 1, p. 19–28, 1 jan. 1995.

HOBAN, M. D.; ORKIN, S. H.; BAUER, D. E. Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. Blood, v. 127, n. 7, p. 839–848, 12 jan. 2016.

HOLSBACH, D. R. *et al.* Investigação bibliográfica sobre a hemoglobina S de 1976 a 2007. Acta Paulista de Enfermagem, v. 23, n. 1, p. 119–124, 2010.

HSU, P.-C. *et al.* Association of Matrix Metalloproteinase-2 Promoter Polymorphisms With the Risk of Childhood Leukemia. Anticancer Research, v. 39, n. 3, p. 1185–1190, 1 mar. 2019.

HUNTLEY, G. W. Synaptic circuit remodelling by matrix metalloproteinases in health and disease. Nature reviews. Neuroscience, v. 13, n. 11, p. 743–757, 1 nov. 2012.

IDRIS, I. M. *et al.* Men with sickle cell disease experience greater sexual dysfunction when compared with men without sickle cell disease. Blood Advances, v. 4, n. 14, p. 3277–3283, 23 jul. 2020.

INGRAM, V. M. Gene Mutations in Human Hæmoglobin: the Chemical Difference Between Normal and Sickle Cell Hæmoglobin. Nature, v. 180, n. 4581, p. 326–328, ago. 1957.

JESTE, N. D. *et al.* Stroke Avoidance for Children in República Dominicana (SACRED): Protocol for a Prospective Study of Stroke Risk and Hydroxyurea Treatment in Sickle Cell Anemia. JMIR Research Protocols, v. 6, n. 6, p. e107, 2 jun. 2017.

JOHNSON, C.; TELEN, M. J. Adhesion molecules and hydroxyurea in the pathophysiology of sickle cell disease. Haematologica, v. 93, n. 4, p. 481–485, 1 abr. 2008.

JORGENSEN, D. R.; ROSANO, C.; NOVELLI, E. M. Can Neuroimaging Markers of Vascular Pathology Explain Cognitive Performance in Adults with Sickle Cell Anemia? A Review of the Literature. Hemoglobin, v. 40, n. 6, p. 381–387, 1 nov. 2016.

KANE, I.; NAGALLI, S. Splenic Sequestration Crisis. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31985957/>>. Acesso em: 8 out. 2020.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. Blood Reviews, v. 21, n. 1, p. 37–47, jan. 2007.

KATO, G. J. *et al.* Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. Blood, v. 107, n. 6, p. 2279–2285, 15 mar. 2006.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. Cell, v. 141, n. 1, p. 52–67, abr. 2010.

KHAYAT, A. S. *et al.* Mutagenicity of hydroxyurea in lymphocytes from patients with sickle cell disease. Genetics and Molecular Biology, v. 27, p. 115–117, 2004.

KOSARAJU, V. *et al.* Imaging of musculoskeletal manifestations in sickle cell disease patients. The British Journal of Radiology, v. 90, n. 1073, p. 20160130, maio 2017.

LACCHINI, R. *et al.* Common matrix metalloproteinase 2 gene haplotypes may modulate left ventricular remodelling in hypertensive patients. Journal of Human Hypertension, v. 26, n. 3, p. 171–177, 1 mar. 2012.

LADU, A. I. *et al.* The spectrum of splenic complications in patients with sickle cell disease in Africa: a systematic review. British Journal of Haematology, v. 193, n. 1, p. 26–42, 7 nov. 2020.

LEE, H.-M. *et al.* Subantimicrobial Dose Doxycycline Efficacy as a Matrix Metalloproteinase Inhibitor in Chronic Periodontitis Patients Is Enhanced When Combined With a Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug. Journal of Periodontology, v. 75, n. 3, p. 453–463, mar. 2004.

LEE, Y. T. *et al.* LIN28B-mediated expression of fetal hemoglobin and production of fetal-like erythrocytes from adult human erythroblasts *ex vivo*. Blood, v. 122, n. 6, p. 1034–1041, 8 ago. 2013.

LEFFLER, H. *et al.* Introduction to galectins. Glycoconjugate Journal, v. 19, n. 7-9, p. 433–440, 2002.

LI, B. *et al.* MIR-144-mediated NRF2 gene silencing inhibits fetal hemoglobin expression in sickle cell disease. Experimental Hematology, v. 70, p. 85-96.e5, fev. 2019.

LI, T. *et al.* The Role of Matrix Metalloproteinase-9 in Atherosclerotic Plaque Instability. Mediators of Inflammation, v. 2020, p. 1–13, 6 out. 2020.

LI, T. *et al.* The interaction effects between TLR4 and MMP9 gene polymorphisms contribute to aortic aneurysm risk in a Chinese Han population. BMC Cardiovascular Disorders, v. 19, n. 1, 29 mar. 2019.

LOUREIRO, M. M.; ROZENFELD, S. Epidemiologia de internações por doença falciforme no Brasil. Revista de Saúde Pública, v. 39, n. 6, p. 943–949, dez. 2005.

LUCARELLI, G. *et al.* Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Thalassemia and Sickle Cell Anemia. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v. 2, n. 5, p. a011825–a011825, 4 abr. 2012.

MACHADO, R. F. P. Hipertensão arterial pulmonar associada à anemia falciforme. Jornal Brasileiro de Pneumologia, v. 33, n. 5, p. 583–591, out. 2007.

Reappraisal of known malaria resistance loci in a large multicenter study. Nature Genetics, v. 46, n. 11, p. 1197–1204, 28 set. 2014.

MARQUES, V. *et al.* REVENDO A ANEMIA FALCIFORME: SINTOMAS, TRATAMENTOS E PERSPECTIVAS. Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente, v. 3, n. 1, p. 39–61, 30 jun. 2012.

MARTIGNETTI, J. A. *et al.* Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome. Nature Genetics, v. 28, n. 3, p. 261–265, jul. 2001.

MARTIN, O. O. *et al.* Invasive pneumococcal disease in children with sickle cell disease in the pneumococcal conjugate vaccine era. Pediatric Blood & Cancer, v. 65, n. 1, p. e26713, 4 jul. 2017.

MARTINS, P. R. J.; MORAES-SOUZA, H.; SILVEIRA, T. B. Morbimortalidade em doença falciforme. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 32, n. 5, p. 378–383, 2010.

MASCIANTONIO, M. G. *et al.* The Balance Between Metalloproteinases and TIMPs: Critical Regulator of Microvascular Endothelial Cell Function in Health and Disease. Progress in Molecular Biology and Translational Science, v. 147, p. 101–131, 2017.

MENZEL, S. *et al.* A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. Nature Genetics, v. 39, n. 10, p. 1197–1199, 1 out. 2007.

ANVISA (BRASIL), A. N. DE V. S. -. Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes, p. 141–141, 2002.

MINNITI, C. P. *et al.* Leg ulcers in sickle cell disease. American Journal of Hematology, v. 85, n. 10, p. 831–833, 23 jul. 2010.

MOLOKIE, R. *et al.* Oral tetrahydrouridine and decitabine for non-cytotoxic epigenetic gene regulation in sickle cell disease: A randomized phase 1 study. PLoS Medicine, v. 14, n. 9, 7 set. 2017.

MOHD, A. A. *et al.* Role of Matrix Metalloproteinases in Cancer. In: Advances in Protein Chemistry. USA, OMICS Group eBooks, 2013.

MOSS, M. L. *et al.* Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. Nature, v. 385, n. 6618, p. 733–6, 1997.

MTATIRO, S. N. *et al.* Genome Wide Association Study of Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia in Tanzania. PLoS ONE, v. 9, n. 11, p. e111464, 5 nov. 2014.

MUNHOZ, F. B. DE A. Associação entre poliforfismo na MMP-13 (isolado e em Haplótipo com MMP-1 e MMP-8) e tendinopatia primária do tibial posterior. educapes.capes.gov.br, 23 abr. 2018.

MUSCELLA, A. *et al.* TGF- β 1 activates RSC96 Schwann cells migration and invasion through MMP-2 and MMP-9 activities. Journal of Neurochemistry, v. 153, n. 4, p. 525–538, 2 dez. 2019.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovascular Research, v. 69, n. 3, p. 562–573, 15 fev. 2006.

NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 22, n. 1, abr. 2000.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. Nature, v. 420, n. 6917, p. 846–852, dez. 2002.

NAVALKELE, P. *et al.* Invasive Pneumococcal Disease in Patients With Sickle Cell Disease. Journal of Pediatric Hematology/Oncology, v. 39, n. 5, p. 341–344, 1 jul. 2017.

NAYCHOV, Z. D. *et al.* TIMP-1 c.T372C Genetic Polymorphism as a Possible Predictor for Acute Aortic Dissection. Hiroshima Journal of Medical Sciences, v. 62, n. 2, p. 31–37, 1 jun. 2013.

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

- GALIZA NETO, G. C. DE; PITOMBEIRA, M. DA S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 39, n. 1, 2003.
- NEWBY, A. C. Dual Role of Matrix Metalloproteinases (Matrixins) in Intimal Thickening and Atherosclerotic Plaque Rupture. Physiological Reviews, v. 85, n. 1, p. 1–31, jan. 2005.
- NYBERG, P. *et al.* Trypsins and their role in carcinoma growth. Experimental Cell Research, v. 312, n. 8, p. 1219–1228, 1 maio 2006.
- OLIVEIRA, V. A. DE *et al.* Association between matrix metalloproteinase-9 gene polymorphism and breast cancer in Brazilian women. Clinics, v. 75, 2020.
- OWEN, C. A.; CAMPBELL, E. J. Extracellular proteolysis: New paradigms for an old paradox. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, v. 134, n. 4, p. 341–351, out. 1999.
- PALADINO, S. F. Úlcera de membros inferiores na anemia falciforme. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 29, n. 3, set. 2007.
- PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LÓPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. Nature Reviews Immunology, v. 4, n. 8, p. 617–629, ago. 2004.
- PAULING, L. *et al.* Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. Science, v. 110, n. 2865, p. 543–548, 25 nov. 1949.
- PÉREZ-HERNÁNDEZ, N. *et al.* The Matrix Metalloproteinase 2-1575 gene Polymorphism is Associated with the Risk of Developing Myocardial Infarction in Mexican Patients. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, v. 19, n. 8, p. 718–727, 2012.
- PESLAK, S. A. *et al.* HRI depletion cooperates with pharmacologic inducers to elevate fetal hemoglobin and reduce sickle cell formation. Blood Advances, v. 4, n. 18, p. 4560–4572, 22 set. 2020.
- PIEL, F. B. *et al.* Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. The Lancet, v. 381, n. 9861, p. 142–151, jan. 2013.
- PLATT, O. S. *et al.* Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. The New England journal of medicine, v. 330, n. 23, p. 1639–44, 1994.

PLATT, O. S. *et al.* Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. Journal of Clinical Investigation, v. 74, n. 2, p. 652–656, 1 ago. 1984.

PRESSIAT, C. *et al.* Impact of renal function on hydroxyurea exposure in sickle-cell disease patients. British Journal of Clinical Pharmacology, v. 87, n. 5, p. 2274–2285, 1 maio 2021.

PULE, G. D. *et al.* Hydroxyurea down-regulates BCL11A, KLF-1 and MYB through miRNA-mediated actions to induce γ -globin expression: implications for new therapeutic approaches of sickle cell disease. Clinical and Translational Medicine, v. 5, n. 1, 7 abr. 2016.

RABINOVICH, G. A. *et al.* Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? Trends in Immunology, v. 23, n. 6, p. 313–320, jun. 2002.

RHODES, C. E.; DENAULT, D.; VARACALLO, M. Physiology, Oxygen Transport. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30855920/>>. Acesso em: 25 nov. 2022.

RF, M. *et al.* Hipertensão Pulmonar Associada à Anemia Falciforme Sickle Cell Disease-Associated Pulmonary Hypertension. Pulmão RJ, v. 24, n. 2, p. 47–54, 2015.

RODRIGUES, D. O. W. *et al.* Genetic determinants and stroke in children with sickle cell disease. Jornal De Pediatria, v. 92, n. 6, p. 602–608, 2016.

ROMANIUK, M. A. *et al.* Identification of galectins as novel regulators of platelet signaling and function. IUBMB life, v. 63, n. 7, p. 521–527, 1 jul. 2011.

ROTHER, R. P. *et al.* The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin. JAMA, v. 293, n. 13, p. 1653, 6 abr. 2005.

ROY, R. *et al.* Metalloproteinases and their roles in human cancer. The Anatomical Record, v. 303, n. 6, p. 1557–1572, 25 jun. 2019.

SABATH, D. E. Molecular Diagnosis of Thalassemias and Hemoglobinopathies. American Journal of Clinical Pathology, v. 148, n. 1, p. 6–15, 12 jun. 2017.

RK, S. *et al.* Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. 1985. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2999980/>>.

SABBATINI, A. R. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 -735C/T polymorphism is associated with resistant hypertension in a specialized outpatient clinic in Brazil. Gene, v. 620, p. 23–29, 15 jul. 2017.

SABBATINI, A. R. *et al.* Increased Circulating Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 Is Associated With Resistant Hypertension. Journal of Clinical Hypertension (Greenwich, Conn.), v. 18, n. 10, p. 969–975, 1 out. 2016.

SANGOKOYA, C.; TELEN, M. J.; CHI, J.-T. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. Blood, v. 116, n. 20, p. 4338–4348, 18 nov. 2010.

SANKARAN, V.G. *et al.* Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. Science, v. 322, n. 5909, p. 1839–42, 2008.

BACKES, C. E. *et al.* Triagem neonatal como um problema de saúde pública. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 27, p. 43–47, 1 mar. 2005.

SANTOS, E. DO C. *et al.* A Description of the Hemolytic Component in Sickle Leg Ulcer: The Role of Circulating miR-199a-5p, miR-144, and miR-126. Biomolecules, v. 12, n. 2, p. 317, 17 fev. 2022.

SARAKUL, O. *et al.* Enhanced erythroid cell differentiation in hypoxic condition is in part contributed by miR-210. Blood Cells, Molecules & Diseases, v. 51, n. 2, p. 98–103, 1 ago. 2013.

SARAVANI, S. *et al.* Association of COL4A3 (rs55703767), MMP-9 (rs17576) and TIMP-1 (rs6609533) gene polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes. Biomedical Reports, v. 6, n. 3, p. 329–334, 9 fev. 2017.

SAWANT, M. *et al.* Does HbF induction by hydroxycarbamide work through MIR210 in sickle cell anaemia patients? British Journal of Haematology, v. 173, n. 5, p. 801–803, 7 set. 2015.

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. Blood, v. 112, n. 10, p. 3927–3938, 15 nov. 2008.

VICHINKSY, E. P. Understating The Morbidity Of Sickle Cell Disease. British Journal of Haematology, v. 99, n. 4, p. 974–982, dez. 1997.

SHEN, B. *et al.* CXCL12-CXCR4 promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer cells. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, v. 14, n. 9, p. 5403–5408, 2013.

SIEREVOGEL, M. J. *et al.* Matrix metalloproteinases: a therapeutic target in cardiovascular disease. Current Pharmaceutical Design, v. 9, n. 13, p. 1033–1040, 2003.

SIMÕES, B. P. *et al.* Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: comitê de hemoglobinopatias. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 32, p. 46–53, maio 2010.

SPRINGMAN, E. B. *et al.* Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a “cysteine switch” mechanism for activation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 87, n. 1, p. 364–368, 1 jan. 1990.

STARLARD-DAVENPORT, A. *et al.* MIR29Bmediates epigenetic mechanisms ofHBGgene activation. British Journal of Haematology, v. 186, n. 1, p. 91–100, 19 mar. 2019.

STEINBERG, M. H. Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. The Scientific World JOURNAL, v. 8, p. 1295–1324, 2008.

STEINBERG, M. H.; ADEWOYE, A. H. Modifier genes and sickle cell anemia. Current Opinion in Hematology, v. 13, n. 3, p. 131–136, maio 2006.

STEINBERG, M. H.; EMBURY, S. H. Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. Blood, v. 68, n. 5, p. 985–990, 1 nov. 1986.

MH, S. *et al.* Disorders of hemoglobin: Genetics, pathophysiology, and clinical management, second edition. www.imm.ox.ac.uk, p. i–iv, 1 jan. 2009.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. Annual Review of Cell and Developmental Biology, v. 17, n. 1, p. 463–516, nov. 2001.

TELEN, M. J. Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease. Blood, v. 127, n. 7, p. 810–819, 12 jan. 2016.

THEIN, S. L. *et al.* Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 104, n. 27, p. 11346–11351, 3 jul. 2007.

TURHAN, A. *et al.* Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: A new paradigm. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 99, n. 5, p. 3047–3051, 5 mar. 2002.

UDA, M. *et al.* Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of α -thalassemia. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 105, n. 5, p. 1620–1625, 1 fev. 2008.

VACEK, T. *et al.* Matrix metalloproteinases in atherosclerosis: role of nitric oxide, hydrogen sulfide, homocysteine, and polymorphisms. Vascular Health and Risk Management, p. 173, fev. 2015.

VAN DEN STEEN, P. E. *et al.* The Hemopexin and O-Glycosylated Domains Tune Gelatinase B/MMP-9 Bioavailability via Inhibition and Binding to Cargo Receptors. Journal of Biological Chemistry, v. 281, n. 27, p. 18626–18637, 3 maio 2006.

VANDOOREN, J.; VAN DEN STEEN, P. E.; OPDENAKKER, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, v. 48, n. 3, p. 222–272, 2 abr. 2013.

VASKŮ, A. *et al.* A haplotype constituted of four MMP-2 promoter polymorphisms (-1575G/A, -1306C/T, -790T/G and -735C/T) is associated with coronary triple-vessel disease. Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology, v. 22, n. 7, p. 585–591, 1 jan. 2004.

VÁŠKŮ, A. *et al.* Two MMP-2 Promoter Polymorphisms (-790T/G and -735C/T) in Chronic Heart Failure. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, v. 41, n. 10, 19 jan. 2003.

VILLAGRA, J. *et al.* Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. Blood, v. 110, n. 6, p. 2166–2172, 15 set. 2007.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. Circulation Research, v. 92, n. 8, p. 827–839, 2 maio 2003.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. Genes & Development, v. 14, n. 17, p. 2123–2133, 1 set. 2000.

WAGENER, F. A. *et al.* Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. Blood, v. 98, n. 6, p. 1802–1811, 15 set. 2001.

WALKER, A. L. *et al.* Epigenetic and molecular profiles of erythroid cells after hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. Blood, v. 118, n. 20, p. 5664–5670, 17 nov. 2011.

WANG, C.-Y. *et al.* Primary Cilium-Regulated EG-VEGF Signaling Facilitates Trophoblast Invasion. Journal of Cellular Physiology, v. 232, n. 6, p. 1467–1477, 29 dez. 2016.

WANG, T. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 gene polymorphisms and their interaction with environment on subarachnoid hemorrhage risk. Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.), v. 243, n. 9, p. 749–753, 1 maio 2018.

WANG, X.; KHALIL, R. A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. Advances in Pharmacology, p. 241–330, 2018.

WARE, R. E. *et al.* Renal Function in Infants with Sickle Cell Anemia: Baseline Data from the BABY HUG Trial. The Journal of Pediatrics, v. 156, n. 1, p. 66-70.e1, jan. 2010.

WARD, C. M.; LI, B.; PACE, B. S. Original Research: Stable expression of miR-34a mediates fetal hemoglobin induction in K562 cells. Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.), v. 241, n. 7, p. 719–729, 1 abr. 2016.

WEBB, A. H. *et al.* Inhibition of MMP-2 and MMP-9 decreases cellular migration, and angiogenesis in in vitro models of retinoblastoma. BMC Cancer, v. 17, n. 1, 20 jun. 2017.

WHELAN, C. J. Metalloprotease inhibitors as anti-inflammatory agents: an evolving target? Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000), v. 5, n. 5, p. 511–516, 1 maio 2004.

WILLIAMS, T. N.; THEIN, S. L. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. Annual Review of Genomics and Human Genetics, v. 19, n. 1, p. 113–147, 31 ago. 2018.

WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 5, n. 8, p. 2145–2154, 1 maio 1991.

YARI, D. *et al.* Association of TIMP-1 and COL4A4 Gene Polymorphisms with Keratoconus in an Iranian Population. Journal of Ophthalmic and Vision Research, 29 jul. 2020.

YAWN, B. P. *et al.* Management of sickle cell disease: summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. JAMA, v. 312, n. 10, p. 1033–48, 2014.

Zago, MA.; Pinto, ACS. The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. Rev Bras Hematol Hemoter. v. 29, p. 207-214, 2007.

ZHANG, D. *et al.* Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. Blood, v. 127, n. 7, p. 801–809, 12 jan. 2016.

ZOU, F. *et al.* Association of Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) Polymorphisms with Asthma Risk: A Meta-Analysis. Canadian Respiratory Journal, v. 2019, p. 9260495, 2019.

ZOU, F. *et al.* Association of Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) Polymorphisms with Asthma Risk: A Meta-Analysis. Canadian Respiratory Journal, v. 2019, p. 9260495, 2019.

**APÊNDICE A – ARTIGO DE REVISÃO SUBMETIDO NA REVISTA
'HEMOGLOBIN'**

**MiRNAs as candidates for the development of strategies for inducing HbF
synthesis in sickle cell disease: a review**

Kleyton P. do Ó^a, Débora N. Nóbrega^a, Roberta S. Souza^a, Isabela CC. Farias^b,
Taciana FM. Belmont^b, Ana KS. Freire^b, Marcos AC. Bezerra^c, Maria SM.
Cavalcanti^b, Luydson RS. Vasconcelos^{*a}

^aAggeu Magalhães Research Center - CPqAM-FIOCRUZ-PE, Recife, Brazil;

*^bInstitute of Biological Sciences and Faculty of Medical Sciences - University of
Pernambuco, Recife, Brazil; ^cDepartment of Biological Sciences - Federal University
of Pernambuco, Recife, Brazil.*

*Corresponding author:

Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Av. Professor Moraes Rego, s/n – Recife – Brazil, Postal code: 50.740-465

E-mail:luydson.vasconcelos@fiocruz.br

Phone/Fax: +55 81 2101 2574

MiRNAs as candidates for the development of strategies for inducing HbF synthesis in sickle cell disease: a review

Abstract

Sickle cell disease (SCD) is caused by the rs334 (A>T) point mutation that leads to changes in the β hemoglobin-globin chain. This promotes the formation of polymers in the erythrocytes, resulting in inflammatory and chronic complications in various organs and tissues. Hydroxyurea (HU) is the most widely used drug for treating patients with SCD. HU reduces neutrophils, reticulocytes, platelet, and cytokine counts, and consequently contributes to the reduction of vascular occlusion processes and therapeutic induction of fetal hemoglobin (HbF) synthesis. However, not all patients respond to HU, and some reverse effects may occur. As possible epigenetic regulators, the miRNAs are being studied as potential influencers in the synthesis of HbF, regulating genes and transcription factors involved in the synthesis pathways of this protein. HU regulates the expression of miRNAs such as miR-15a, miR16-1, miR-26b, miR-151-3p, miR-451, miR210, miR-29a, miR-130b, miR-148a, miR-192, miR-194, miR-215 and miR-494, such as, the canonical pathways, cGMP-PKG and MAPK, and genes, *BCL11A*, *MYB*, *STAT3*, *NRF2*, *DNMT3A* and *DNMT3B*, which may influence the synthesis of HbF are associated with miRNAs: miR-19b-1-5p; miR-582-5p; miR-301b-3p; miR-2115-5p; miR376a-3p; miR-186-3p; miR-1200; miR-3680-5p; miR-935; miR-615-5p; miR-3652; miR-4321; miR-1207-5p; miR-4251; miR-132-5p ; miR-125a-3p; miR-135b-5p; miR-557; miR-4255; miR-29b, miR-34a, miR-144. Therefore, the study of these molecules is important for developing of new therapeutic strategies in SCD.

Keywords: sickle cell disease; microRNAs; fetal hemoglobin; HbF.

Introduction

The presence of hemoglobin HbS that originates from a single base change rs334 (A>T) that leads to the substitution of the amino acid glutamic acid by valine in position 6 of the β -globin chain of hemoglobin cause Sickle cell disease (SCD) [1]. The disease may occur in homozygosity for the rs334 mutation (HbSS) (called sickle-cell anemia-SCA), which presents a higher mortality rate and greater severity in clinical manifestations, and heterozygosity composed of rs334 and mutations that lead to other structural variants of β -globin, such as HbSC and HbS/ β -thalassemia. However, in these ways, SCA stands out as the most serious, gaining focus in several studies around the world [2,3].

SCD is more prevalent in sub-Saharan Africa; the Mediterranean basin; the Middle East; India. This high prevalence is related to the natural selection process since these HbS individuals (in heterozygosis) have protection against severe malaria, where in almost 12,000 severe cases of malaria and more than 17,000 controls distributed in Africa, Asia and Oceania, attributed to about 86% of the risk reduction of severe malaria to the heterozygous genotype HbAS [4,5]. Due to the slave trade and the large flow of contemporary population migrations, the SCD has spread around the world, becoming a public health problem in many regions [6]. It is estimated that around 300,000 children with SCA, are born worldwide [7]. Approximately 100,000 people live with SCD in the United States [8]. In sub-Saharan Africa, at least 240,000 children are born with SCD [9]. Cançado *et al.* [10] estimate that 4% of the Brazilian population has sickle cell trait (HbAS) and that 25,000 to 50,000 people have the disease in a homozygous state (HbSS) or the condition of heterozygotes [10]. Currently, in Brazil, it is estimated that it varies from 60,000 to 100,000 cases [11].

When oxygen levels decrease in circulation, HbS polymerization occurs in long fibers, which make the erythrocytes rigid and sickle-shaped, decreases their flexibility and makes them difficult to pass through vessels, especially those of smaller calibers [12,13]. The sickle cell process is the first factor behind the pathophysiological consequences of SCA that occur in conditions of low oxygen tension, in these conditions, erythrocytes undergo both structural and functional changes that lead to harmful consequences in various organs and tissues of the body [14,15].

The sickle cell process has a great impact on chronic inflammatory manifestations, which are characteristics present in SCA and result from several

factors that interconnect and feedback, generating a permanent inflammatory cycle where the emergence is linked to three interrelated mechanisms: (1) the involvement of erythrocytes, granulocytes, monocytes and platelets to the vascular endothelium, causing occlusion-vascular; (2) chronic inflammatory phenomena and occurrence of hemolysis, exacerbated by acute episodes and production of inflammatory intermediates such as cytokines; (3) changes in nitric oxide metabolism and oxidative stress [16].

SCD presents asymptomatic periods interspersed with periods of intense symptomatology, involving several organs. Clinical manifestations occur when HbF levels in the blood are reduced to values below 30%, this usually happens around the sixth month of life [17]. In the second decade of life, the chances of the appearance of complications in organs such as kidneys, lungs, and eyes due to the occurrence of vascular occlusions, which with ischemia-reperfusion, activation of the vascular endothelium, and hemolysis, determine most of the signs and symptoms present in the clinical picture of patients, such as hemolytic crises, pain crises, dactylitis, acute thoracic syndrome, acute splenic sequestration, retinopathy, chronic renal failure, splenectomy, stroke, cognitive problems, priapism, infections (mainly by bacteria), painful episodes caused by vascular obstruction, and the appearance of leg ulcers. [18-21].

Hydroxyurea (HU) is the most widely used drug for treating patients with SCA, licensed by the US Food and Drug Administration. It is a chemotherapy agent that was initially used for treating cancers and came to be used in SCA about three decades ago. HU inhibits ribonucleotide reductase, an enzyme involved in DNA synthesis. HU reduces neutrophils, reticulocytes, platelet, and cytokine counts, and consequently contributes to the reduction of vascular occlusion processes. Moreover, the most prominent factor in the use of HU is the therapeutic induction of HbF synthesis [22,23]. Because HbF mitigates the effects of the modified beta chain in the disease, where high levels of HbF decrease hemolysis, it has a beneficial effect on clinical complications, which reduce hospitalization and increases survival [24]. However, adverse effects may occur due to the use of HU, such as infertility, susceptibility to infections, or teratogenic effects [25]. Not all patients respond to HU therapy, and it is essential to understand the molecular mechanisms involved in the regulation of γ – globin to develop HbF induction strategies is fundamental for the discovery of other effective therapeutic options for SCD [26].

Although the induction of HbF expression has been successful, however, there is still much to be evaluated concerning this aspect, since several factors can influence, it such as epigenetics, highlighting the influence of microRNAs [24,27].

MicroRNAs are short molecules of 18-25bp, which are not properly encoded in proteins, they bind to the untranslated 3' region (UTR) genes and can inhibit their expression, in addition, miRNAs can act in the degradation and inhibition of translation [24,28,29]. These regulate about 40 – 70% genes of the human genome [27]. Currently, in the literature, we already see that some miRNAs are associated with HbF [26,27,30-34]. Despite being a single-based disease, the complexity of discovering an effective treatment or cure is very great. In more than 30 years of studies involving SCD, only chronic blood transfusion, especially for cases susceptible to stroke development, and hydroxyurea therapy has been implemented more effectively.

Recently, technological advances have led to the development of new drugs that address different aspects of the pathophysiology of SCD, but these are not yet widely used in the clinical practice patients [35]. Therefore, the discovery of genetic markers and molecules that may be future therapeutic targets is of paramount importance for SCD, given that other genes and epigenetic factors interfere with the severity of the disease, this has been the target in recent studies for clinical and therapeutic diagnostic approaches in these patients, and here we cite miRNAs as promising molecules for development of new strategies to improve the quality of life and survival of these patients. Thus, this review analyzed in the literature the miRNAs that are associated with the regulation of HbF in patients with SCD.

Materials and Methods

This study has a descriptive character, which allows through the analysis of research in the scientific literature the search for knowledge about a subject of paramount importance, related to a public health problem in many regions of the world that as SCD. From this, at the beginning of the research, the: definition of the target theme was performed; inclusion and exclusion criteria; bibliographic research; tabulation of the data obtained; interpretation of the results and writing of the review [36].

After the conducting question was defined, which miRNAs are related to HbF in patients with SCD from different regions of the world. For this, the following databases of bibliographic scientific research were used: PubMed (U.S. National Library of Medicine) (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>); Scielo (Scientific Electronic Library

Online) (<https://www.scielo.org/>); MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online) (<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&base=MEDLINE&lang=p&form=F>); LILACS (Latin American and Caribbean Literature on Health Sciences) (<https://lilacs.bvsalud.org/>).

The articles were searched out between April and July 2022. The following Health Sciences Descriptors (DeCS) were used: *Sickle-cell anemia; sickle cell disease; micro RNA; miRNA; hemoglobin F; HbF*. To perform the search with a focus on the conducting question, the descriptors were combined using the boolean operator *AND* at the intersection, for example, Sickle-cell Anemia AND miRNA AND HbF. The inclusion criteria used were articles in any language; human studies with sickle cell disease or experimental study; any publication date. The following were excluded: dissertations, theses, reviews, duplicate articles between the research bases, and articles that did not contemplate the research's guide question.

Results

During the bibliographic search, in the PubMed database, which showed the most results in the research, there are more than 29 thousand papers using the descriptor sickle cell disease, the result of more than 30 years of research from the discovery of the disease to this day.

With the application of the combined descriptors focusing on the miRNA and HbF relationship, 82 articles were found, with a first reading of the titles and abstracts, 18 articles were filtered, after a thorough reading of these articles, only 7 presented the characteristics required for research and were then selected, the remaining 75 were excluded, because they did not contemplate the conducting question or were duplicated between searches (figure 1). At first, we noticed that despite a very significant number of papers on the disease in the literature, very few approach miRNAs and their relationship with HbF, an extremely important molecule to reduce the harmful effects of the disease [26,27,30-34]. Thus, we highlight the importance of further studies on this theme.

The first selected article dates from 2011, showing that the approach to this theme is relatively recent, which may be due to the development of the most advanced and accessible molecular biology techniques in research laboratories, as well as bioinformatics tools that facilitate data processing and speed in analysis. The other

articles are distributed on the following dates: [n=1] 2015; [n=1] 2016; [n=3] 2019; [n=1] 2021, Totaling 7 articles.

MiRNAs that were found with variations in their expression, and that may have some direct or indirect relationship with HbF are listed in table 1.

Discussion

Das *et al.* [27] when performing differential expression analysis between a group of patients with elevated HbF levels and another with normal HbF levels, observed that miRNAs were differentially expressed between the groups. Additionally, these differentially expressed miRNAs regulate genes that are also differentially expressed, being cGMP-PKG (*ATP2A2, ADCY9, MEF2C, NOS3, NFATC1, NFATC2, PDE5A, SRF, SLC8A1*) and MAPK (*DUSP6, FGFR1, MAP2K4, MAP3K7, MEF2C, NFATC1, SRF*) during HbF synthesis. that need to be tested [27]. And these authors showed advances focused on these interactions, with the use of Valproate (anticonvulsant agent appointed as a good candidate for studies in patients with SCA), this drug negatively regulates the expression of miR-125-3p that three targets MAPK pathway genes (*MEF2C, FGFR1, and NFATC1*), thus, which may induce the synthesis of HbF [27].

In patients with SCD and thalassemia, based on genome association studies, in single nucleotide polymorphisms (SNPs), it was seen that about 30-50% of inherited variations in HbF levels in different populations are associated with three genetic loci, including -158 *Xmn1-HBG2, BCL11A* in 2p15 and *the HBS1L-MYB region, with BCL11A* has the highest influence on HbF expression, silencing the γ -globin gene [37-41].

The HU is also involved in the regulation of certain miRNAs and consequently in HbF levels. With significant positive regulation of miR-15a and miR16-1 in 6h post-treatment, these are known *MYB* inhibitors, also miR-151-3p and miR-451 were regulated upward after 6h of treatment. However, these miRNAs were adjusted after 12h and returned to baseline after 24h of treatment with HU [25]. The negative regulation of *MYB* in erythroid cells and K562 is related to the induction of γ -globin expression, and inversely related to the microRNAs miR-26b, miR-15a, and miR-16-1, which are implicated in the increase in HbF production because they target the transcription factor *MYB* [25]. These authors also highlight that in vitro inhibition of miR-26b, miR-151-3p, and miR-451 results in decreased HbF, this effect may be due to

miR-26b having the ability to inhibit the translation of *MYB*, which in turn causes reduced activation of KLF-1, decreasing *the expression of BCL11A*, and consequently increasing the production of HbF [25].

Also, about HU and miRNAs, different from Pule *et al.* [25]; Sawant *et al.* [33] analyzed the expression of miR-210 in 10 individuals with SCA before and after 3 months of HU therapy (10 mg/kg/d), in addition to 10 normal individuals for the control group. This author identified 4.11 ± 1.11 times in mir-210 expression in patients with untreated SCA compared to healthy normal controls. MiR210 expression was significantly regulated upwards in patients after HU therapy with an increase of 7.49 ± 1.031 ($P < 0.05$) compared to baseline, suggesting a role of miR-210 in HbF induction. where this miRNA can increase the expression of HBG1/HBG2 (γ -globin genes) during the differentiation of erythroid cells [33,42]. Additionally, the reduction of globin gene expression and delayed maturation of K562 cells and erythroid progenitor cells inhibit of miR-210 expression [43]. Some molecular targets for miR-210 (HDAC1, SIN3A, PLK1, PTBP3 [ROD1], E2F3, RPTOR [KIAA1303], FANK1, CYB5R2), have been with involvement in HBG2 regulation and HbF induction [33,44].

In the study by Walker *et al.* [34] 10 miRNAs were differentially expressed among CD71+ cells of the 3 patient groups evaluated (HbSS before treatment; HbSS post-treatment with HU/maximum tolerated dose (DMT); HbAA) ($P < 0.05$); miR-26b, miR-29a, miR-130b, miR-148a, miR-151-3p, miR-192, miR-194, miR-215, and miR-494 were all significantly regulated upwards, while miR-223 was set down. Of these, miR-148a, miR-151-3p, and miR-494 were significantly regulated upwards by HU. Only the expression of miR-26b was significantly associated with HbF levels, being inversely related to baseline HbF levels [34].

In addition to the transcription factors mentioned above, miRNAs can act in the DNA methylation process, which in turn can regulate the transcription of several genes. With this, it has been seen that the decrease in methylation of the HBG gene reactivates its transcription. For example, HbF was induced in patients with SCD treated intravenously with DNA-methyltransferase inhibitor (DNMT) decitabine (Dec) [45,30]. MiRNAs can be important molecules in this regulatory process, where in silico analysis showed that miR-29b has a complementary consensus sequence to the region 3'-not translated from *DNMT3A* and *DNMT3B* (genes encoding proteins involved in DNA methylation), indicating the importance of evaluating miRNAs in this methylation process [30]. Starlard-Davenport *et al.* [30] showed that miR-29b, a DNMT

inhibitor, reactivates *HBG* gene transcription and HbF synthesis in human primary erythroid progenitor cells, in addition, increased the expression of miR-29b in reticulocytes isolated from individuals with SCD and elevated HbF levels provide additional evidence for the clinical relevance of this molecule. Thus, these authors suggest future studies evaluate the ability of miR-29b to mediate epigenetic effects to activate *HBG* transcription and HbF expression in SCD progenitors or preclinical mouse models, which are desirable for developing treatments for SCD and other β -hemoglobinopathies. Since strategies to inhibit DNA methylation machinery, generating hypomethylation of the *HBG* promoter may be an effective approach for the therapeutic induction of HbF in patients with SCD [30,45].

Still, Ward *et al.* [32] in their study with human cells K562 and HEK293, saw once again the interaction of miRNA with transcription factors that regulate the γ -globin gene. This author suggests that miR-34a has a binding site in stat3's 3'UTR (which has been implicated in the regulation of the γ -globin gene). Showing an indirect mechanism of the activation of γ -globin by miR-34a by silencing the *STAT3* gene [32].

In differential expression analysis of miRNAs isolated from reticulocytes CD71+, Li *et al.* [26] showed that in 12 individuals with SCD, separated into high HbF and low HbF, the expression of miR-144-3p (miR-144) and miR-144-5p increased 7.96 times ($p=0.0010$) and 7.79 times ($p=0.0037$), respectively, in the low HbF group compared to the high HbF group [26]. Additionally, miR-144 influences the occurred and clinical evolution of leg ulcers in patients with SCD [46].

The miR-96-5p and let-7b-5p implicated in the regulation of the globin gene had increased expression in the low HbF group, bringing evidence that the increase in the levels of these miRNAs is associated with reduced HbF and that they may be possible indicators of disease severity since low levels of HbF are implicated in more severe anemia [26]. Repression of miRNA let-7 expression by LIN28 causes a 19 to 40% increase in HbF levels in patients with SCA [47]. Alternatively, miR-1, miR-5701, and miR-2116-3p were negatively regulated in the low HbF group; these can silence repressors of the γ -globin expression, showing that different miRNAs can act in various ways on the regulation of HbF [26].

Oxidative stress, which is widely studied in patients with SCA, has also shown to be important in this relationship of miRNAs with HbF. In vitro analysis in normal erythroid and sickle cell progenitors under oxidative stress supports an miR-144/NRF2 model of regulation of the globin γ -globin gene [26]. Silencing the *NRF2* gene by

overexpression of miR-144 leads to the repression of the transcription of the γ -globin gene and HbF synthesis; but this effect can be reversed as the treatment with anti-miR-144 [26]. Reinforcing this idea has already linked the expression of miR-144 and NRF2 to oxidative stress, redox potential and severity of anemia in SCD [26,48,49]. Taking this as an example, the development of antagomirs can be used for the discovery of HbF-inducing molecules, where studies in experimental and pre-clinical models can better establish this relationship in the future.

Here, it was seen that the treatment with HU can modify the expression of some miRNAs and with this influence the synthesis of HbF. As well as, so far, we have seen that miRNAs act mainly indirectly on HbF, as it regulates other genes, such as various transcription factors and even molecules involved in DNA methylation. With this, we recommend that further studies be conducted to detect other miRNAs involved in this process, and particularly experimental studies and clinical trials with the already mentioned miRNAs can bring important applications of these molecules for treatment of clinical events of SCD.

Conclusion

According to the research criteria, seven articles were selected, showing that this theme, miRNAs and their relationship with HbF, there is still much to be discovered and reinforced from this theme. It has also been discovered that HU, a widely used drug to regulate HbF levels in patients with SCD, modifies the expression of miRNAs such as miR-15a, miR-16-1, miR-26b, miR-151-3p, miR-451, miR210, miR-29a, miR-130b, miR-148a, miR-192, miR-194, miR-215, and miR-494. Moreover, in general, these miRNAs act on biological pathways that induce or block the expression of HbF, depending on the situation.

Other authors have also highlighted in their studies miRNAs that may be important for regulating HbF because they act in biological pathways and genes present in the synthesis of HbF such as the pathways, cGMP-PKG and MAPK, and genes, *BCL11A*, *MYB*, *STAT3*, *NRF2*, *DNMT3A*, and *DNMT3B*. The main miRNAs highlighted are: miR-19b-1-5p; miR-582-5p; miR-301b-3p; miR-2115-5p; miR376a-3p; miR-186-3p; miR-1200; miR-3680-5p; miR-935; miR-615-5p; miR-3652; miR-4321; miR-1207-5p; miR-4251; miR-132-5p; miR-125a-3p; miR-135b-5p; miR-557; miR-4255; miR-29b, miR-34a, miR-144. With this, continuing to study these molecules is of

paramount importance, especially in the development of experimental and clinical studies.

Acknowledgments

The present work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Finance Code 001. We are grateful for the IAM/Fiocruz (Aggeu Magalhães Institute/Oswaldo Cruz Foundation) scholarship financial support.

Disclosure statement

The authors inform that there are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for the content and writing of this article.

References

- [1]. Goldstein J, Konigsberg W, Hill RJ. The structure of human hemoglobin. VI. The sequence of amino acids in the tryptic peptides of the beta chain. *J Biol Chem.* 1963;238:2016-27.
- [2]. Williams TN, Thein SL. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2018;19:113-147..
- [3]. Ingram VM. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature.* 1957;180(4581):326-8.
- [4]. Malaria Genomic Epidemiology Network; Malaria Genomic Epidemiology Network. Reappraisal of known malaria resistance loci in a large multicenter study. *Nat Genet.* 2014;46(11):1197-204.
- [5]. Piel FB, Patil AP, Howes RE, et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun.* 2010;1:104.
- [6]. Piel FB, Tatem AJ, Huang Z, et al. Global migration and the changing distribution of sickle haemoglobin: a quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. *Lancet Glob Health.* 2014;2(2):e80-9.

- [7]. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2017 Apr 20;376(16):1561-1573.
- [8]. Onimoe G, Rotz S. Sickle cell disease: A primary care update. *Cleve Clin J Med*. 2020;87(1):19-27.
- [9]. Williams TN. Sickle Cell Disease in Sub-Saharan Africa. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2016;30(2):343-58.
- [10]. Cançado RD, Jesus JA. Sickle cell disease in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(3):203-6.
- [11]. Ministry of Health. JOINT ORDINANCE No. 05, OF FEBRUARY 19, 2018. Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines for Sickle Cell Disease. Accessed on 05/17/2021. Link: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2018/fevereiro/22/Portaria-Conjunta-PCDT-Doenca-Falciforme.fev.2018.pdf>
- [12]. Santos-Silva MC, Mallman FG, Dassi T, et al. Neonatal screening as a public health problem. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2005;27;43-47.
- [13]. Jorgensen DR, Rosano C, Novelli EM. Can Neuroimaging Markers of Vascular Pathology Explain Cognitive Performance in Adults With Sickle Cell Anemia? A review of the Literature. *Hemoglobin*. 2016;40(6):381-387.
- [14]. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1997;337(11):762-9.
- [15]. Zhang D, Xu C, Manwani D, et al. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood*. 2016;127(7):801-9.
- [16]. Zago, MA.; Pinto, ACS. The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29;207-214.
- [17]. Loureiro MM, Rozenfeld S. Epidemiology of hospitalizations for sickle cell disease in Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2005;39(6); .943-9.

- [18]. Marques V, Souza RAPR, Ramos LJ, et al. Reviewing sickle cell anemia: Symptoms, treatment and outlook. *Rev Cie Fac Edu Mei Amb.* 2012;3(1);39-61.
- [19]. Kosaraju V, Harwani A, Partovi S, et al. Imaging of musculoskeletal manifestations in sickle cell disease patients. *Br J Radiol.* 2017;90(1073):20160130.
- [20]. Johnson C, Telen MJ. Adhesion molecules and hydroxyurea in the pathophysiology of sickle cell disease. *Haematologica.* 2008;93(4):481-5.
- [21]. Chalchal H, Rodino W, Hussain S, et al. Impaired venous hemodynamics in a minority of patients with chronic leg ulcers due to sickle cell anemia. *Vasa.* 2001;30(4):277-9.
- [22]. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med.* 1994;330(23):1639-44.
- [23]. Pressiat C, Rakotoson MG, Habibi A, et al. Impact of renal function on hydroxyurea exposure in sickle-cell disease patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2020.
- [24]. Verma HK, Ratre YK, Bhaskar LVKS, et al. Erythrocyte microRNAs: a tiny magic bullet with great potential for sickle cell disease therapy. *Ann Hematol.* 2021;100(3):607-614.
- [25]. Pule GD, Mowla S, Novitzky N, et al. Hydroxyurea down-regulates BCL11A, KLF-1 and MYB through miRNA-mediated actions to induce γ -globin expression: implications for new therapeutic approaches of sickle cell disease. *Clin Transl Med.* 2016;5(1):15.
- [26]. Li B, Zhu X, Ward CM, et al. MIR-144-mediated NRF2 gene silencing inhibits fetal hemoglobin expression in sickle cell disease. *Exp Hematol.* 2019;70:85-96.e5.
- [27]. Das SS, Sinha R, Chakravorty N. Integrative microRNA and gene expression analysis identifies new drug repurposing candidates for fetal hemoglobin induction in β -hemoglobinopathies. *Gene.* 2019;706:77-83.
- [28]. Zhang Z, Tang H, Ma Y, et al. Identification of key miRNAs affecting broilers with valgus-varus deformity by RNA sequencing and analysis of miRNA-mRNA interactions. *Mol Omics.* 2021.

- [29]. Pop MA, Almquist BD. Controlled Delivery of MicroRNAs into Primary Cells Using Nanostraw Technology. *Adv Nanobiomed Res.* 2021;1(6):2000061.
- [30]. Starlard-Davenport A, Smith A, Vu L, et al. MIR29B mediates epigenetic mechanisms of HBG gene activation. *Br J Haematol.* 2019;186(1):91-100.
- [31]. Starlard-Davenport A, Gu Q, Pace BS. Targeting Genetic Modifiers of HBG Gene Expression in Sickle Cell Disease: The miRNA Option. *Mol Diagn Ther.* 2022;26(5):497-509.
- [32]. Ward CM, Li B, Pace BS. Original Research: Stable expression of miR-34a mediates fetal hemoglobin induction in K562 cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016;241(7):719-29.
- [33]. Sawant MSC, Colah R, Ghosh K, et al. Does HbF induction by hydroxycarbamide work through MIR210 in sickle cell anaemia patients? *Br J Haematol.* 2016;173(5):801-3.
- [34]. Walker AL, Steward S, Howard TA, et al. Epigenetic and molecular profiles of erythroid cells after hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. *Blood.* 2011;118(20):5664-70.
- [35]. Telen MJ. Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease. *Blood.* 2016;127(7):810-9.
- [36]. Botelho LLR, Cunha, CCA, Macedo M. The integrative review method in organizational studies. *Gestão e sociedade.* 2011;5(11):121-36.
- [37]. Menzel S, Garner C, Gut I, et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nat Genet.* 2007;39(10):1197-9.
- [38]. Thein SL, Menzel S, Peng X, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(27):11346-51.

- [39]. Bae HT, Baldwin CT, Sebastiani P, et al. Meta-analysis of 2040 sickle cell anemia patients: BCL11A and HBS1L-MYB are the major modifiers of HbF in African Americans. *Blood*. 2012;120(9):1961-2.
- [40]. Mtatiro SN, Singh T, Rooks H, et al. Genome wide association study of fetal hemoglobin in sickle cell anemia in Tanzania. *PLoS One*. 2014 Nov 5;9(11):e111464.
- [41]. Sankaran VG, Menne TF, Xu J, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science*. 2008;322(5909):1839-42.
- [42]. Bianchi N, Zuccato C, Lampronti I, et al. Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of gamma-globin gene expression. *BMB Rep*. 2009;42(8):493-9.
- [43]. Sarakul O, Vattanaviboon P, Tanaka Y, et al. Enhanced erythroid cell differentiation in hypoxic condition is in part contributed by miR-210. *Blood Cells Mol Dis*. 2013;51(2):98-103.
- [44]. Bianchi N, Finotti A, Ferracin M, et al. Increase of microRNA-210, decrease of raptor gene expression and alteration of mammalian target of rapamycin regulated proteins following mithramycin treatment of human erythroid cells. *PLoS One*. 2015;10(4):e0121567.
- [45]. Molokie R, Lavelle D, Gowhari M, et al. Oral tetrahydrouridine and decitabine for non-cytotoxic epigenetic gene regulation in sickle cell disease: A randomized phase 1 study. *PLoS Med*. 2017;14(9):e1002382.
- [46]. Santos EDC, Melo GIV, Santana PVB, et al. A Description of the Hemolytic Component in Sickle Leg Ulcer: The Role of Circulating miR-199a-5p, miR-144, and miR-126. *Biomolecules*. 2022;12(2):317.
- [47]. Lee YT, de Vasconcellos JF, Yuan J, et al. LIN28B-mediated expression of fetal hemoglobin and production of fetal-like erythrocytes from adult human erythroblasts ex vivo. *Blood*. 2013;122(6):1034-41.

[48]. Sangokoya C, Telen MJ, Chi JT. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood*. 2010;116(20):4338-48.

[49]. Chen SY, Wang Y, Telen MJ, et al. The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases. *PLoS One*. 2008;3(6):e2360.

Fig. 1 Summary of the search for articles in the databases

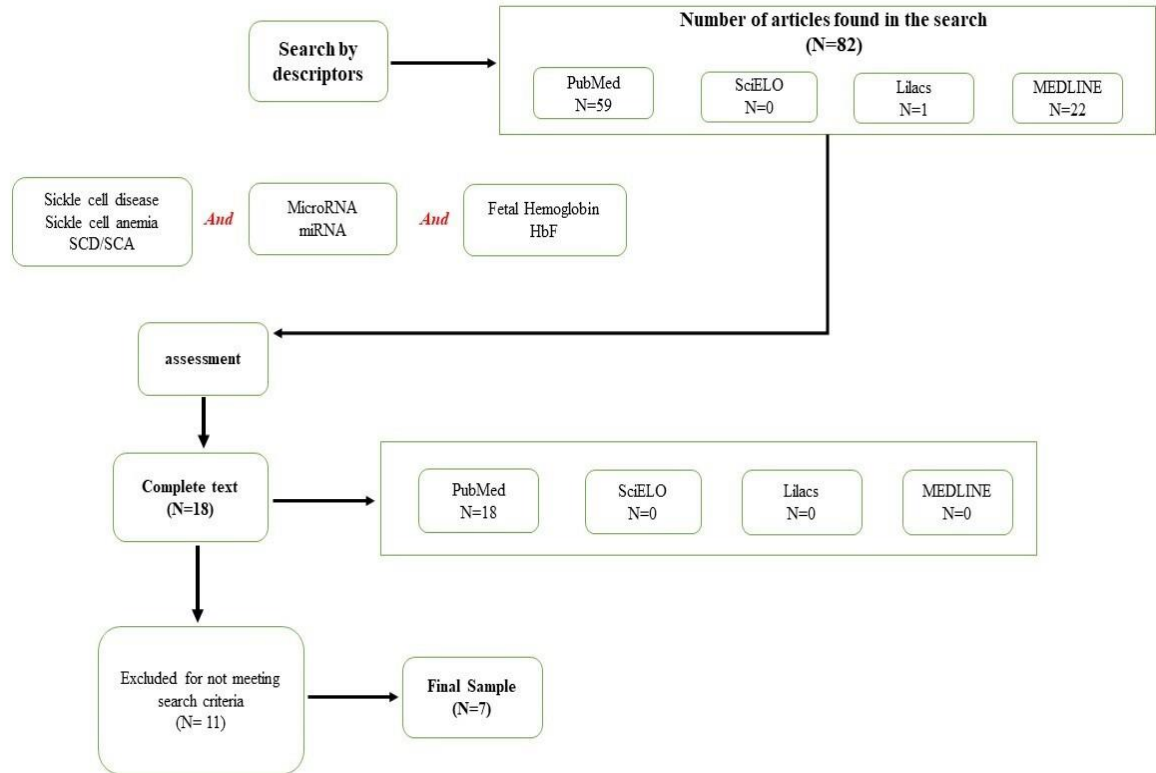


Table 1. Main miRNAs related to HbF, according to the literature.

miRNAs	Targets	Influence on HbF	References
miR-26b	GATA-1, MYB	Increasing gene expression γ globin.	[34]
miR-151-3p	BCL11A, MYB, KLF1	Induction of the expression of γ -globin.	[34]
miR-29B	DNMT3A and 3B	Increased expression of the γ globin.	[30]
MiR-210	BCL11A	HbF production.	[33,42]
miR-15A, miR-16-1	MYB	Increasing gene expression γ globin.	[34,41]
miR-34A	STAT3	activation of γ -globin.	[32]
MiR-451	KLF1, GATA-1	Induction of transcription of γ globin.	[34]
Let-7	BCL11A	When negatively regulated, the expression of HbF increases.	[26]
MiR-144	NRF2	Low HbF levels; Oxidative stress; Hemolysis.	[26]
MiR-96	HBG	Suppresses the expression of the γ globin.	[26]
miR-125-3p	MEF2C, FGFR1, NFATC1	induce the synthesis of HbF	[27]

GATA-1= GATA binding protein; MYB= MYB Proto-Oncogene, Transcription Factor; B-cell; BCL11A= lymphoma/leukemia 11A; KLF1= Krüppel-like factor 1; DNMT3A= DNA methyltransferase 3 alpha; DNMT3B= DNA methyltransferase 3 beta; STAT3= signal transducer and activator of transcription 3; NRF2= NF-E2-related factor 2, miR microRNA; HBG= hemoglobin subunit gamma 1/2; FGFR1= Fibroblast growth factor receptor 1 protein; NFATC1= Nuclear Factor Of Activated T Cells 1; MEF2C=Myocyte Enhancer Factor 2C; HbF= fetal hemoglobin.

APÊNDICE B – ARTIGO ACEITO NA REVISTA ‘MOLECULAR BIOLOGY REPORTS’

DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08262-2>

Polymorphisms and gene expression of Metalloproteinases and their inhibitors associated with cerebral ischemic stroke in young patients with sickle cell anemia

Kleyton P. do Ó¹, Ana KS. Freire², Débora N. de Nóbrega¹, Roberta S. Souza¹, Isabela CC. Farias², Taciana FM. Belmont², Andreia S da Silva², Gabriela S. Arcanjo³, Aderson S. Araujo⁴, Ana CM. dos Anjos³, Antônio RL. Araujo³, Marcos AC. Bezerra³, Patricia MMF. Moura², Maria SM. Cavalcanti², Luydson RS. Vasconcelos*¹

¹Instituto Aggeu Magalhães Research Center - IAM-FIOCRUZ-PE, Recife (Pernambuco), Brazil; ²Institute of Biological Sciences and Faculty of Medical Sciences - University of Pernambuco, Recife (Pernambuco), Brazil; ³Department of Biological Sciences - Federal University of Pernambuco, Recife (Pernambuco), Brazil. ⁴Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco – HEMOPE

*Corresponding author:

Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Recife - Brazil, Postal code: 50.740-465

E-mail: luydson.vasconcelos@fiocruz.br

Phone/Fax: +55 81 2101 2574

ORCIDs

Kleyton Palmeira do Ó- kleyton.palmeira@ufpe.br - [0000-0002-5271-879X](https://orcid.org/0000-0002-5271-879X)

Ana Karla da Silva Freire- akarlasf@hotmail.com - [0000-0003-0338-9536](https://orcid.org/0000-0003-0338-9536)

Débora Nascimento de Nóbrega- deborannobrega@uis.pe.senac.br - [0000-0002-1181-5542](https://orcid.org/0000-0002-1181-5542)

Roberta dos Santos Souza- robertssantos53@gmail.com - [0000-0003-3999-3284](https://orcid.org/0000-0003-3999-3284)

Isabela Cristina Cordeiro Farias- isabela.c.farias@hotmail.com - [0000-0003-4550-2998](https://orcid.org/0000-0003-4550-2998)

Taciana Furtado de Mendonça Belmont- tacianafm@hotmail.com - [0000-0001-7332-1962](https://orcid.org/0000-0001-7332-1962)

Andreia Soares da Silva- andreiasoares.upe@hotmail.com - [0000-0003-1600-6899](tel:0000-0003-1600-6899)
Gabriela da Silva Arcaño - gabriela.sarcanjo@ufpe.br - [0000-0002-1736-0227](tel:0000-0002-1736-0227)
Aderson da Silva Araujo- aderson.araujo@gmail.com - [0000-0003-1733-5053](tel:0000-0003-1733-5053)
Ana Cláudia Mendonça dos Anjos- ana.anjos@ufpe.br - [0000-0003-4206-4347](tel:0000-0003-4206-4347)
Antônio Roberto Lucena de Araujo- antonio.araujo@ufpe.br - [0000-0003-1694-8958](tel:0000-0003-1694-8958)
Marcos André Cavalcanti Bezerra- marcos.cbezerra@ufpe.br - [0000-0002-0175-6147](tel:0000-0002-0175-6147)
Patricia Muniz Mendes Freire de Moura- patricia.moura@upe.br - [0000-0003-4259-388X](tel:0000-0003-4259-388X)
Maria do Socorro Mendonça Cavalcanti- socorro.cavalcanti@upe.br - [0000-0001-6235-2739](tel:0000-0001-6235-2739)
Luydson Richardson Silva Vasconcelos- luydson.vasconcelos@fiocruz.br - [0000-0002-1625-3358](tel:0000-0002-1625-3358)

Abstract

Background

Sickle cell anemia (SCA) is a genetic disease with great clinical heterogeneity and few viable strategies for treatment; hydroxyurea (HU) is the only widely used drug. Thus, the study of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and the gene expression of MMPs 1, 2, 9, 7 and TIMPs 1 and 2, which are involved in the regulation of extracellular matrix, inflammation, and neuropathies, may provide further insights into the pathophysiology of the disease and elucidate biomarkers and molecules as potential therapeutic targets for patients with SCA.

Methods and Results

We evaluated 251 young individuals with SCA from northeastern Brazil. The groups were divided according to vaso-occlusive crisis (VOC) and cerebrovascular disease (CVD), compared to control individuals. SNP detection and gene expression assays were performed by real-time PCR, TaqMan system®. Both the expression levels of MMP1 gene, and the SNP MMP1 -1607 1G/2G were associated with the risk of cerebral ischemic stroke (IS), and the expression of MMP1 was also associated with a higher frequency of VOC/year. Expression levels of MMP7, TIMP1, and TIMP2 were increased in patients conditioned to IS. The SNP 372T>C (rs4898) TIMP1 T alleles were more frequent in patients with >5 VOC events/year. The SNP rs17576 of MMP9 showed differences in gene expression levels; it was increased in the genotypes AG, and AG+GG.

Conclusion

The findings of this study, the SNPs, and expression provide initial support for understanding the role of MMPs-TIMPs in the pathophysiology of SCA in young patients.

Keywords: Sickle cell anemia; metalloproteinases; Ischemic stroke; vaso-occlusion crisis.

Introduction

Sickle cell anemia (SCA) is a genetic disease caused by an abnormality in the hemoglobin present in erythrocytes, where there is a substitution of an adenine nitrogen base for thymine (GAG→GTG), resulting in the exchange of the amino acid glutamic acid for valine at position 6 of the β -globin chain [1,2]. The SCA clinic is extremely variable and the reasons for this heterogeneity are not fully understood, ranging from almost asymptomatic to clinically severe forms that are responsible for high mortality, especially in young people [1,3,4]. Inflammatory manifestations, hemolysis, and vascular occlusion arising from changes in the endothelium, involvement of erythrocytes, granulocytes, monocytes, and platelets to the endothelium, in addition to changes in nitric oxide metabolism and oxidative stress, are the pathophysiological characteristics related to most of the signs and symptoms occurring in patients [5].

Cerebral ischemic stroke (IS) is one of the leading causes of disability in the world. IS is the most serious event in SCA with a higher chance of causing morbidity and mortality [6]. IS usually results from complications of vaso-occlusion crisis (VOC), and the ischemic type is the most frequent; in addition, the risk of developing this event can be measured by transcranial doppler ultrasound (TCD), which measures the speed of blood flow; velocities (≥ 200 cm/s) are considered to pose a high risk of developing IS and, thus, patients are referred to preventive transfusion therapy [7,8].

The vascular alterations found in SCA presents are similar to those that occur in hypertension and atherosclerosis, e.g., vascular occlusion and change in blood flow pressure [9]; for this reason, molecules that control basic cellular functions and regulate the extracellular matrix (ECM) may be important in SCA. Thus, metalloproteinases (MMPs) and their endogenous tissue inhibitors (TIMPs), which have not yet been well studied in SCA, may clarify some gaps in the pathophysiology of the disease, because these act in the mechanism of regulation of homeostasis of the extracellular matrix of humans and influence the activity of other proteases, cytokines, cell surface ligands, and growth factors [10,11]. The main functions performed by MMPs-TIMPs are bone remodeling, wound healing, angiogenesis, cell replacement, remyelination, restoration of connectivity and neurovascular integrity, and regulation of inflammatory responses [12].

MMPs may play a very important role in the pathophysiology of IS in patients with SCA, i.e., they may enhance tissue regeneration, which is essential for recovery of an ischemic injury or accident, on the other hand the MMPs could increase the blood-brain barrier (BBB) permeability, the down-regulation of cav-1 was correlated with increased MMP-2 and -9 activities and enhanced BBB permeability. However, this relationship is not yet fully understood owing to the multi-functionality of these proteins in addition to other factors that may affect the performance of MMPs, such as TIMPs, the chemokine pattern present in tissues, and epigenetic factors [13-15]. Thus, the aim of this study was to evaluate the Single nucleotide polymorphisms (SNPs) and the expression of these genes and broaden current knowledge about the role of these molecules in SCA.

Materials and Methods

Study population

This study was characterized as cross-sectional. We evaluated 251 young SCA patients up to 18 years of age, the samples were collected by spontaneous demand during outpatient care from April 2022 to August 2022 at the Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco (HEMOPE), through Hemoglobin electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (BioRad, Hercules, CA, USA). Within the protocol of this program, patients are vaccinated against pneumococcus (Pneumo 7 - Wyeth Pharmaceuticals Inc. USA) and meningococci (Meningitisc - Wyeth Pharmaceuticals, UK). Also, they used penicillin (4 U/Kg/day) up to 5 years of age; consequently, there was a more homogeneous sample for the study. The patients' clinical data were collected from standardized medical records provided by the medical archive of the HEMOPE foundation. Patients on hypertransfusion or transfusion therapy in the last three months prior to biological sample collection were excluded; patients treated in hospitals other than HEMOPE were also excluded to avoid discrepancies in clinical information. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study and the parents.

The groups study consisted of SCA patients (HbSS genotype) divided into the following groups according to the clinical phenotype: 1) cerebral IS+ (patients with a history of ischemic stroke) vs cerebral IS- (patients without history of ischemic stroke). 2) high-risk (HR) for IS (rated by transcranial doppler ultrasound-TCD) vs Conditional (cond.) for IS (rated by TCD) vs Normal (patients without alterations in the TCD). 3)

Cerebrovascular disease (CVD+) (patients who had a history of IS or abnormal TCD values) vs CVD- (patients without had a history of IS or abnormal TCD values). 4) VOC >5 (patients who presented more than 5 vaso-occlusive events per year) [patients in severe state] vs VOC 2 to 5 (patients who presented 2 to 5 vaso-occlusive crisis events per year) [patients in moderate state] vs VOC >2 (patients who presented more than 2 vaso-occlusive crisis per year) [patients in steady state], According Belini Junior, et al., 2015 [16]. All primary strokes were confirmed by baseline brain magnetic resonance imaging. The TCD values were classified as Normal (less than 170 cm/s); Conditioning (170-199 cm/s); High Risk (≥ 200 cm/s) according Adams, et al. 1998 [17].

Collection and processing of samples

Peripheral blood samples were collected by vacuum venous puncture in Vacutainer tubes containing EDTA anticoagulant. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were obtained by ficoll-hypaque density gradient centrifugation (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden). Genomic DNA extraction from leukocytes was performed using the phenol-chloroform technique, according Davis, et al. 1986 [18]. Total RNA from PBMCs was determined using the extraction method in Trizol (Invitrogen, UK) according to the manufacturer's instructions.

Complementary DNA synthesis (cDNA)

The total RNA samples were quantified using spectrophotometry technology with the NanoDrop 2000 (ThermoScientific) equipment to measure the concentration of mRNA and verify contaminants in the sample. To obtain the cDNA sequences, High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, CA, USA) was used, according to the manufacturer's instructions.

Detection of polymorphic variants of MMP1, MMP2, MMP9, TIMP1, and TIMP2 genes

For detection of *MMP2*-1306 C/T polymorphisms, rs243865 (C__3225943_10), *MMP2* rs2285053 C/T (C__26734093_20), *MMP9* C/T, rs17576 (C__11655953_10), *TIMP1* +372 C/T, rs4898 (C__11175659_10) and *TIMP2* -418 G/C, rs7501477 (C__26078833_10), we used the real-time PCR, TaqMan system®. To perform this technique, the Quantistudio5 equipment (Thermo Scientific, CA, USA) was used at the

Center of Technological Platforms-NPT of the Instituto Aggeu Magalhães- IAM FioCruz-PE.

Expression of genes MMP1, MMP2, MMP9, MMP7, TIMP1, and TIMP2

Relative quantification of mRNAs was performed using the real-time PCR technique, using taqMan® Assays (Applied Biosystems, CA, USA), ACTB (Beta-actin gene, Hs01060665_g1) technology was used as endogenous control. The results were analyzed using the comparative method $\Delta\Delta CT$ ($2^{(-\Delta\Delta CT)}$) for relative quantification of gene expression.

Data analysis methods

Allelic frequencies were estimated by the gene counting method using the software pLINK v.1.07. The existence of associations between categorical variables was evaluated by Pearson's Chi-square tests, or Fisher's exact, when appropriate. The differences were considered as significant for $p < 0.05$. The magnitude of these associations was estimated as odds ratio (OR), using 95% confidence intervals. To compare the continuous variables between two groups, either the t-Student test or the Mann-Whitney nonparametric test was applied, and for comparison between more than two groups, the ANOVA or the Kruskal Wallis test was applied, when appropriate. The GraphPad v.6.0 program. (San Diego, California, USA) was used for these analyses.

Ethical considerations

This project was approved by the Research Ethics Committee (CEP CAAE (94534218.0.0000.5192)). The participants and guardians of the project participants, after receiving information about the study, signed the Free and Informed Consent Form.

Results

Clinical characteristics of patients

All individuals with SCA come from northeastern Brazil, and homozygotes for the HbSS genotype, based on information obtained from medical records. Approximately 49% of the patients are male and 51%, female; in addition, the study sample was composed

of young patients with a mean age of approximately 14 years. Only hemoglobin (Hb) values were statistically different between groups: IS+ (7.731 g/dL \pm 0.8130); High Risk TCD (7.490 g/dL \pm 0.9714); Conditional TCD (7.781 g/dL \pm 0.7722) and the control group: Normal TCD (8.093 g/dL \pm 0.9232), [p=0.0078]. Hydroxyurea (HU) was also more prevalent in the case groups compared to the control [p<0.0001]. The other variables did not show different mean values among the study groups (**Table 1**).

Genotypic frequency of *MMP1*, *MMP2*, *MMP9*, *TIMP1*, and *TIMP2* genes

A number of 251 patients were genotyped for SNPs rs1799750 *MMP1*, rs2285053 *MMP2*, rs243865 *MMP2*, rs17576 *MMP9*, rs4898 *TIMP1* and rs7501477 *TIMP2*. There is variation in N between the association groups because of the lack of information on clinical events in the patients' medical records; therefore, some individuals could not be genotyped. For all SNPs, the distribution of genotypes in the case and control groups were within the Hardy-Weinberg equilibrium, $p > 0.05$ (**Table SI 1**). Only the SNP rs4898 *TIMP1* presented a higher allelic T frequency distribution in the group of patients with VOC>5 events/year compared to the control group, with OR= 1.757 (1.042- 2.962, 95% CI), ($p= 00452$) (**Table 2**). Moreover, the 1G/1G genotype of SNP rs1799750 *MMP1* presented higher frequency in the group of patients at high risk for IS when compared to genotype 1G/2G ($p=0.0278$), OR=3.667 (1.249- 10.76, 95% CI) (**Table 3**). The other SNPs did not present a significant association between the case and the study control groups. In the groups of patients with IS and CVD, no significant differences were found between the frequencies of the SNPs of the *MMPs-TIM* genes (**Table SI 2 and 3**).

Gene Expression *MMPs-TIMPs*

Table 4 shows the fold change values of the gene expression of each case group in comparison to the normal control group. These data show a more pronounced gene expression of *MMP1* when compared to the others, with a fold change of 3.32 in comparison to the control group (**Table 4**).

The expression levels of the *MMP1*, *MMP2*, *MMP7*, *MMP9*, *TIMP1*, and *TIMP2* genes were measured by qPCR of the PBMC of HbSS homozygotes patients, with a history or risk of cerebral IS, and in patients with a history of VOC, compared to patients

without clinical/control manifestation. An overview of the genic expression is shown in the heatmap of **Fig 1**.

Regarding the expression of *MMPs-TIMPs* genes in patients with SCA and CVD, there was a significant difference in the expression of the *MMP1* gene with higher levels of expression in individuals with CVD compared to control patients, $p=0.0002$ (**Fig 2**).

When evaluating only patients with a history of IS compared to patients without IS, the *MMP1* gene showed higher expression in patients with history of IS, $p=0.0269$ (**Fig 3**).

The expression levels of *MMPs-TIMPs* genes were also measured in patients at risk of developing IS. The *MMP1* gene was more expressed in the groups of patients with conditional TCD for IS, $p=0.0016$, and a higher expression was also found in patients at high risk for IS, $p=0.0419$. The genes *MMP7* and *TIMP1* and *TIMP2* were also more expressed in patients at risk for IS, $p=0.0141$ and $p=0.0262$, $p=0.0021$, respectively (**Fig 3**). The *MMP2* and *MMP9* genes did not show significant differences in expression levels in these groups.

In patients with a history of VOC, only the expression of the *MMP1* gene was significantly increased in patients with ≥ 2 VOC/year, compared to patients with < 2 events/year, $p=0.0262$ (**Fig 2**). The other *MMPs-TIMPs* genes were not associated with VOC in the study groups.

We also evaluated the expression of *MMPs-TIMPs* among the groups of patients who use HU compared to those who do not use it, to analyze whether HU interferes with the expression levels of these genes, but there was no association of the expression of these genes when HU was used (**Fig SI 1**).

Evaluations were made of the levels of gene expression among the genotypes of each SNP of this study. Only the SNP rs17576 of *MMP9* showed significant differences in genic expression among genotypes, where genotype AG, $p=0.0135$, and AG+GG, $p=0.0065$, showed higher levels of expression when compared to genotype AA (**Fig 4**). The other genes did not show a relationship between genotypes and gene expression. The study of the correlation between *MMPs* and *TIMPs* showed no relationship between these genes in the patients of this study (**Fig SI 1**).

Discussion

To our knowledge, this was the first study to evaluate SNPs and expression of *MPPs* genes and their *TIMP* inhibitors in young patients with cerebrovascular and vaso-

occlusive manifestations. The expression levels of the *MMP1* gene were higher in patients with CVD, and a history of IS, patients with changes in TCD, and individuals with ≥ 2 VOC events/year compared to patients without these manifestations. According to Ito, *et al.* 2020 [19] in endothelial colony-forming cells (ECFCs) present in peripheral blood, the differential expression indicated overexpression of the *MMP1* gene in ECFCs of adults with SCA and IS [19]. The functional hypothesis in *MMP1* in SCA involves the process of angiogenesis - an important event in SCA which can be regulated by *MMP1*. There are reports that angiogenesis contributes to neurological repair involving the remodeling of the ECM [19-21]. *MMP1* is secreted by macrophages during the inflammatory process digesting elastin and degrading the basal membrane [22]. In the literature, there are previous reports of the action of this molecule also in inflammatory diseases [19,23]; for example, in atherosclerotic stroke, it acts in the migration of vascular smooth muscle cells, differentiation of monocytes, and collagen degradation types I, II and III [24-26]. As chronic inflammation is a key event in SCA we indicate studies that correlate *MMP1* with inflammatory markers in SCA. Furthermore, we believe that high levels of *MMP1* may be associated with excessive degradation of the extracellular matrix and maintenance of chronic inflammation, which would be harmful to patients with SCA.

About 90% of cerebral ISs can be avoided with preventive blood transfusion therapy in patients with high flow detected by TCD, but the risk of IS reappears when transfusion therapy is discontinued [17,27]. In addition, as patients grow older, their skull matures, and it becomes more difficult to screen them for TCD; for this reason, other risk factors need to be detected to complement the use of TCD screening, with a view to increasing chance of preventing IS [27]. In this study, *MMP1* stands out as a promising molecule for this purpose.

We found that the 1G/1G genotype of the *MMP1* gene was more frequent in patients at high risk for IS compared to genotype 1G/2G, $p=0.0278$, $OR=3.667$ (1.249- 10.76, 95% CI). However, these findings are still very preliminary and require further studies to confirm and understand the effect of this SNP on the disease. We found no association between SNP and *MMP1* expression levels, but it could be seen that in fibroblast, melanoma, and endothelial cells of the human umbilical vein, the presence of the 2G allele is associated with higher levels of *MMP1* [28,29]. In addition to SNP, other factors may regulate gene expression levels, such as circular RNAs, miRNAs, other proteases, cytokines, cell surface ligands, and growth factors [10,11,30], and this

may be one of the reasons why there was no relationship between SNP and gene expression in this study.

Gene expression of *MMP7* was also increased in patients at risk of developing brain IS. According to a study in The Cancer Genome Atlas (TCGA), *MMP7* levels were significantly increased in individuals with several types of cancers [31]. In cancer, the role of this molecule is linked to the degradation of casein, fibronectin, collagen and proteoglycans. Therefore, it has an influence on the genesis and development of tumors, reduction of cell formation, inhibition of apoptosis and onset of vasculogenesis [31,32]. In the elderly in Sweden, circulating levels of *MMP7* were independently associated with cerebral IS; thus, this molecule can be seen as a risk factor and a possible marker for cerebral IS [33]. Although there are few studies on this MMP, it may play an important role in the regulation of the ECM and inflammation in the IS of SCA individuals, because in patients with cardiovascular disease, *MMP7* levels were increased in comparison to control individuals, and *MMP7* can activate pro-*MMP8* in *MMP8*, especially in the inflammatory process of cardiovascular disease [34].

In this study, the SNP rs17576 of *MMP9* showed significant differences in gene expression among genotypes; genotype AG, $p=0.0135$, and AG+GG, $p=0.0065$, showed higher levels of expression of the *MMP9* gene when compared to genotype AA. No previous studies have shown an association of this SNP with the mRNA expression levels of the *MMP9* gene. However, it was found that the variant G allele is associated with increased levels of *MMP9* in plasma in patients with cardiovascular disease [35-37].

Zielińska-Turek, *et al.* 2022 [38] reported increased levels of *MMP9* in patients with IS compared to patients with asymptomatic carotid stenosis [38]. Cai, *et al.* 2022 [39], in their study with male Sprague-Dawley rats submitted to the model of occlusion of the middle cerebral artery (MCAO), found that *MMP9* expression levels were significantly higher in these animals. This author further suggested that inhibition of *MMP9* can protect the integrity of the blood-brain barrier by preserving proteins from tight junction proteins in ischemic brain injury [39]. Thus, the relationship of this molecule in brain disease is due to the fact that *MMP9* acts on type IV collagen, fibronectin, and laminin, the main components of the basal lamina, i.e., it has an influence on the late opening of the blood-brain barrier after ischemic brain injury [14]. Therefore, we do not rule out the importance of new studies involving this MMP and its potential as a marker and even therapeutic target for SCA.

In this study, only the SNP 372 T > C (Phe124Phe; rs4898) *TIMP1* presented a higher allelic T frequency distribution in the group of patients with VOC>5 events/year compared to the control group with less than 2 events/year, with OR= 1.757 (1.042-2.962, 95% CI), (p= 0.0452). This was the first study to evaluate this SNP in SCA individuals. VOC is one of the events responsible for triggering most signs and symptoms in patients with SCA, including cerebral IS [40]. However, the effects of this SNP on the expression of the *TIMP1* gene are unknown, and we did not find a relationship between the SNP and the gene expression of *TIMP1*.

We also found that the *TIMP1* gene was more expressed in patients at risk for cerebral IS, p=0.0262. In patients with IS and stenosis $\geq 70\%$, *TIMP1* levels were higher than in patients after endarterectomy; this finding points out that this may be a good predictive factor for cerebral IS [38]. The function of *TIMP1* in brain disease is related to inhibition of MMP9 activity [41]. In their study of Su, *et al.* 2019 [41] with rats, the injection of recombinant human *TIMP1* (rh*TIMP1*, 1.60 $\mu\text{g}/\text{kg}/36\text{ h}$) decreased the expression and activation of MMP9 in the cortex, and thereby decreased IS, indicating that direct inhibition of activation of MMP9 via exogenous rh*TIMP1* exerts a neuroprotective effect against stroke in cold-induced rats, and eases the imbalance between MMP9 and *TIMP1* [41]. Intravenous injection of *TIMP1* nanoparticles [42], *TIMP1* injected *TIMP1*-cDNA plasmids [43], helped maintain blood barrier integrity by increasing *TIMP1* levels in the central nervous system.

In this study, the *TIMP2* gene was also more expressed in group with patients conditioning to cerebral IS, p=0.0021. In resistant arterial hypertension, plasma *TIMP2* levels were also increased, suggesting unbalanced MMP2 activity in hypertension [44]. In cerebrovascular diseases, according to the current literature, the imbalance between *TIMP2* and MMP2 was related to remodeling and vascular dysfunction [45], hemorrhagic transformation after cerebral ischemia [46], cerebral aneurysm [47] and rupture of the blood-brain barrier [48].

Some limitations can be pointed out in this study; for example, the small number of patients, when some groups are stratified. The number of cases was greatly reduced compared to controls; aspects as robust exclusion criteria, such as hypertransfusion therapy for patients at high risk for stroke, caused the sample size to be reduced. Therefore, we recommend new studies including functional experimental studies with knockout genes for *MMPs-TIMPs*.

Conclusion

The *MMP1* gene, both the SNP *MMP1* -1607 1G/2G and the expression levels were associated with the risk of IS; the expression of gene *MMP1* was also associated with higher frequency of VOC/year. Expression levels of *MMP7*, *TIMP1* and *TIMP2* were increased in patients conditioning to cerebral IS. The SNP 372T>C (rs4898) *TIMP1* T allele was more frequent in patients with >5 VOC events/year. The SNP rs17576 of *MMP9* showed differences in gene expression levels, i.e., it was increased in the genotypes AG, and AG+GG. The findings of this study, provide initial support for an understanding of the role of MMPs-TIMPs in the pathophysiology of SCA in young patients and indicate them as potential biomarkers and therapeutic targets.

References

1. Miranda CTOF, Vermeulen-Serpa KM, Pedro ACC, Brandão-Neto J, Vale SHL, Figueiredo MS. Zinc in sickle cell disease: A narrative review. *J Trace Elem Med Biol.* 2022 Jul;72:126980. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.126980>
2. Sales RR, Nogueira BL, Tosatti JAG, Gomes KB, Luizon MR. Do Genetic Polymorphisms Affect Fetal Hemoglobin (HbF) Levels in Patients With Sickle Cell Anemia Treated With Hydroxyurea? A Systematic Review and Pathway Analysis. *Front Pharmacol.* 2022 Jan 21;12:779497. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.779497>
3. Vichinsky EP. Understating the morbidity of sickle cell disease. *Br J Haematol.* 1997 Dec;99(4):974-6; author reply 976-7. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.5013304.x>
4. Higgs DR, Wood WG. Genetic complexity in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Aug 19;105(33):11595-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806633105>
5. Zago, MA; Pinto, ACS. The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007; 29; 207-214. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000300003>
6. Alakbarzade V, Maduakor C, Khan U, Khandanpour N, Rhodes E, Pereira AC. Cerebrovascular disease in sickle cell disease. *Pract Neurol.* 2022 Sep 19;practneurol-2022-003440. <http://dx.doi.org/10.1136/pn-2022-003440>

7. Estcourt LJ, Kohli R, Hopewell S, Trivella M, Wang WC. Blood transfusion for preventing primary and secondary stroke in people with sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 Jul 27;7(7).
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD003146.pub4>
8. Williams TN, Thein SL. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2018 Aug 31;19:113-147.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083117-021320>
9. Kavanagh PL, Fasipe TA, Wun T. Sickle Cell Disease: A Review. *JAMA*. 2022 Jul 5;328(1):57-68. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.10233>
10. Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Rüth FX, Nagase H, Tschesche H, Maskos K. Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Jun 30;878:73-91. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07675.x>
11. Roy R, Morad G, Jedinak A, Moses MA. Metalloproteinases and their roles in human cancer. *Anat Rec (Hoboken)*. 2020 Jun;303(6):1557-1572.
<https://doi.org/10.1002/ar.24188>
12. Simões G, Pereira T, Caseiro A. Matrix metalloproteinases in vascular pathology. *Microvasc Res*. 2022 Sep;143:104398.
<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2022.104398>
13. Batra A, Latour LL, Ruetzler CA, Hallenbeck JM, Spatz M, Warach S, Henning EC. Increased plasma and tissue MMP levels are associated with BCSFB and BBB disruption evident on post-contrast FLAIR after experimental stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2010;30(6):1188-1199.
<http://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.1>
14. Lakhan SE, Kirchgessner A, Tepper D, Leonard A. Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke. *Front Neurol*. 2013 Apr 3;4:32. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00032>
15. Yang N, Lin M, Wang BG, Zeng WY, He YF, Peng HY, Zeng J, Wu ZY, Zhong Y. Low level of low-density lipoprotein cholesterol is related with increased hemorrhagic transformation after acute ischemic cerebral infarction. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(4):673-8.
16. Belini Junior E, Silva DG, Torres Lde S, Okumura JV, Lobo CL, Bonini-Domingos CR. Severity of Brazilian sickle cell disease patients: severity

- scores and feasibility of the Bayesian network model use. *Blood Cells Mol Dis*. 2015 Apr;54(4):321-7. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.01.011>
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 Jul 2;339(1):5-11. <https://doi.org/10.1056/nejm199807023390102>
 18. Davis LG, Dibner MD, Battey JF. *Basic Method in Molecular Biology*. Londres: Elsevier, 1986, pp. 338-388. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620290605>
 19. Ito MT, da Silva Costa SM, Baptista LC, Carvalho-Siqueira GQ, Albuquerque DM, Rios VM, Ospina-Prieto S, Saez RC, Vieira KP, Cendes F, Ozelo MC, Saad STO, Costa FF, Melo MB. Angiogenesis-Related Genes in Endothelial Progenitor Cells May Be Involved in Sickle Cell Stroke. *J Am Heart Assoc*. 2020 Feb 4;9(3):e014143. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.014143>
 20. Hermann DM, Zechariah A. Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009 Oct;29(10):1620-43. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.100>
 21. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2005 Apr-Jun;9(2):267-85. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00355.x>
 22. Zhang G, Li W, Guo Y, Li D, Liu Y, Xu S. MMP Gene Polymorphisms, MMP-1 -1607 1G/2G, -519 A/G, and MMP-12 -82 A/G, and Ischemic Stroke: A Meta-Analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018 Jan;27(1):140-152. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.08.021>
 23. Huang XY, Han LY, Huang XD, Guan CH, Mao XL, Ye ZS. Association of Matrix Metalloproteinase-1 and Matrix Metalloproteinase-3 Gene Variants with Ischemic Stroke and Its Subtype. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2017;26(2):368-375. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.09.034>
 24. Wesley RB 2nd, Meng X, Godin D, Galis ZS. Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 Mar;18(3):432-40. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.18.3.432>

25. Rocnik EF, Chan BMC, Pickering G. Evidence for a role of collagen synthesis in arterial smooth muscle cell migration. *J Clin Invest.* 1998; 101:1889-98.
<https://doi.org/10.1172/JCI1025>
26. Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, Clowes AW. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation.* 1995 Sep 15;92(6):1393-8.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.92.6.1393>
27. Platt OS. Prevention and management of stroke in sickle cell anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:54-7.
<https://doi.org/10.1182/asheducation-2006.1.54>
28. Affara M, Dunmore BJ, Sanders DA, Johnson N, Print CG, Charnock-Jones DS. MMP1 bimodal expression and differential response to inflammatory mediators is linked to promoter polymorphisms. *BMC Genomics.* 2011 Jan 19;12:43. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-43>
29. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, Brinckerhoff CE. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res.* 1998;58:5321–5325.
30. Liu H, Lan T, Li H, Xu L, Chen X, Liao H, Chen X, Du J, Cai Y, Wang J, Li X, Huang J, Yuan K, Zeng Y. Circular RNA circDLC1 inhibits MMP1-mediated liver cancer progression via interaction with HuR. *Theranostics.* 2021 Jan 1;11(3):1396-1411. <https://doi.org/10.7150/thno.53227>
31. Meng N, Li Y, Jiang P, Bu X, Ding J, Wang Y, Zhou X, Yu F, Zhang Y, Zhang J, Xia L. A Comprehensive Pan-Cancer Analysis of the Tumorigenic Role of Matrix Metalloproteinase 7 (MMP7) Across Human Cancers. *Front Oncol.* 2022 Jun 17;12:916907. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.916907>
32. li M, Yamamoto H, Adachi Y, Maruyama Y, Shinomura Y. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006 Jan;231(1):20-7.
<https://doi.org/10.1177/153537020623100103>
33. Lind L, Siegbahn A, Lindahl B, Stenemo M, Sundström J, Ärnlov J. Discovery of New Risk Markers for Ischemic Stroke Using a Novel Targeted Proteomics Chip. *Stroke.* 2015 Dec;46(12):3340-7.
<https://doi.org/10.1161/strokeaha.115.010829>

34. Tuomainen AM, Kormi I, Havulinna AS, Tervahartiala T, Salomaa V, Sorsa T, Pussinen PJ. Serum tissue-degrading proteinases and incident cardiovascular disease events. *Eur J Prev Cardiol.* 2014 Jul;21(7):806-12.
<https://doi.org/10.1177/2047487312465524>
35. Luizon MR, Belo VA, Fernandes KS, Andrade VL, Tanus-Santos JE, Sandrim VC. Plasma matrix metalloproteinase-9 levels, MMP-9 gene haplotypes, and cardiovascular risk in obese subjects. *Mol Biol Rep.* 2016 Jun;43(6):463-71.
<https://doi.org/10.1007/s11033-016-3993-z>
36. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L; AtheroGene Investigators. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation.* 2003 Apr 1;107(12):1579-85.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.0000058700.41738.12>
37. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1999 Apr 13;99(14):1788-94.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.99.14.1788>
38. Zielińska-Turek J, Dorobek M, Turek G, Dąbrowski J, Ziemia A, Andziak P, Barcikowska-Kotowicz M. MMP-9, TIMP-1 and S100B protein as markers of ischemic stroke in patients after carotid artery endarterectomy. *Pol Merkuriusz Lekarski.* 2022 Jun 24;50(297):177-182. <http://medpress.com.pl/shop>
39. Cai H, Huang LY, Hong R, Song JX, Guo XJ, Zhou W, Hu ZL, Wang W, Wang YL, Shen JG, Qi SH. Momordica charantia Exosome-Like Nanoparticles Exert Neuroprotective Effects Against Ischemic Brain Injury via Inhibiting Matrix Metalloproteinase 9 and Activating the AKT/GSK3 β Signaling Pathway. *Front Pharmacol.* 2022 Jun 24;13:908830.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.908830>
40. Kosaraju V, Harwani A, Partovi S, Bhojwani N, Garg V, Ayyappan S, Kosmas C, Robbin M. Imaging of musculoskeletal manifestations in sickle cell disease patients. *Br J Radiol.* 2017 May;90(1073):20160130.
<https://doi.org/10.1259/bjr.20160130>
41. Su YY, Li HM, Yan ZX, Li MC, Wei JP, Zheng WX, Liu SQ, Deng YT, Xie HF, Li CG. Renin-angiotensin system activation and imbalance of matrix

- metalloproteinase-9/tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in cold-induced stroke. *Life Sci.* 2019 Aug 15;231:116563.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116563>
42. Chaturvedi M, Molino Y, Sreedhar B, Khrestchatisky M, Kaczmarek L. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for delivery across the blood-brain barrier. *Int J Nanomedicine.* 2014 Jan 20;9:575-88. <https://doi.org/10.2147/ijn.s54750>
43. Chen F, Radisky ES, Das P, Batra J, Hata T, Hori T, Baine AM, Gardner L, Yue MY, Bu G, del Zoppo G, Patel TC, Nguyen JH. TIMP-1 attenuates blood-brain barrier permeability in mice with acute liver failure. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013 Jul;33(7):1041-9. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.45>
44. Sabbatini AR, Barbaro NR, de Faria AP, Modolo R, Ritter AM, Pinho C, Amorim RF, Fontana V, Moreno H. Increased Circulating Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 Is Associated With Resistant Hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2016 Oct;18(10):969-975.
<https://doi.org/10.1111/jch.12865>
45. Castro MM, Rizzi E, Figueiredo-Lopes L, Fernandes K, Bendhack LM, Pitó DL, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis.* 2008;198:320–31.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.10.011>
46. Lorenzi S, De Pasquale G, Segal AZ, Beal MF. Dysregulation of the levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in the early phase of cerebral ischemia. *Stroke.* 2003 Jun;34(6):e37-8; author reply e37-8. <https://doi.org/10.1161/01.str.0000075563.45920.24>
47. Aoki T, Kataoka H, Moriwaki T, Nozaki K, Hashimoto N. Role of TIMP-1 and TIMP-2 in the progression of cerebral aneurysms. *Stroke.* 2007 Aug;38(8):2337-45. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.107.481838>
48. Krizanac-Bengez L, Hossain M, Fazio V, Mayberg M, Janigro D. Loss of flow induces leukocyte-mediated MMP/TIMP imbalance in dynamic in vitro blood-brain barrier model: role of pro-inflammatory cytokines. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Oct;291(4):C740-9. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00516.2005>

Statements and Declarations

The authors inform that there are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for the content and writing of this article. The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Acknowledgments

The present work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Funding Code 001. We are grateful for the IAM/Fiocruz (Aggeu Magalhães Institute/Oswaldo Cruz Foundation) for awarding us a scholarship as a form of financial support.

Author contribution

(Kleyton Palmeira do Ó, Débora Nascimento de Nóbrega, Roberta dos Santos Souza, Ana Karla da Silva Freire) performed experiments, analyzed and interpreted data, and drafted the manuscript. (Isabela Cristina Cordeiro Farias, Gabriela da Silva Arcanjo, Ana Cláudia Mendonça dos Anjos, Kleyton Palmeira do Ó) recruited patients, updated the clinical data, and reviewed the manuscript. (Kleyton Palmeira do Ó, Antônio Roberto Lucena de Araujo, Marcos André Cavalcanti Bezerra, Luydson Richardson Silva Vasconcelos, Taciana Furtado de Mendonça Belmont) analyzed and interpreted data, performed statistical analyses and drafted the manuscript. (Patricia Muniz Mendes Freire de Moura, Maria do Socorro Mendonça Cavalcanti, Marcos André Cavalcanti Bezerra, Aderson da Silva Araujo, Luydson Richardson Silva Vasconcelos, Taciana Furtado de Mendonça Belmont) conceived and designed the study and reviewed the manuscript.

Table 1 Demographic and clinical features according to study groups of patients with Sickle Cell Anemia.

	IS+ (n=16)	HR (n=23)	Cond. (n=43)	Normal (n=142)	p
Age (Years)	14.34 (3.965)	14.55 (3.794)	14.75 (3.369)	13.70 (3.344)	0.2779
Sex F	9 (56%)	13 (56%)	23 (53%)	70 (49%)	0.7588
BT (mg/dL)	2.596 (2.460)	2.297 (1.408)	1.942 (1.003)	2.123 (1.412)	0.958
Hb g/dL	7.731 (0.8130)	7.490 (0.9714)	7.781 (0.7722)	8.093 (0.9232)	0.0078
HU	12 (75%)	20 (87%)	36 (84%)	66 (46%)	< 0.0001
Leukocytes x100 (/uL)	200.4 (91.14)	165 (35.61)	151.8 (40.23)	155.6 (55.60)	0.4104
Platelets x1000 (/uL)	433.1 (201.2)	423.6 (106.9)	499.6 (179.1)	470.9 (144.1)	0.5213
Red blood [M/mm ³)	2.732 (0.2041)	2.547 (0.2759)	2.519 (0.3712)	2.726 (0.5093)	0.1017
GOT (U/L)	54.33 (9.018)	27.60 (13.39)	42.73 (10.43)	43.43 (17.31)	0.1074
GPT (U/L)	21 (6.083)	14.80 (4.919)	16.92 (3.872)	21.29 (12.87)	0.5178

IS+= patients with a history of stroke; HR= patients at high risk for IS; Cond. = Patients conditioning for IS; Hb= hemoglobin; GOT= glutamate-oxalate-transaminase; GPT= Glutamate-Pyruvate Transaminase; BT= Total Bilirubin; HU= Hydroxyurea. The p values were considered significant when <0.05, and the tests applied for the analyses were: Kruskal-Wallis and Chi-square.

Table 2 Frequency of SNPs of *MMPs-TIMPs* genes in patients with sickle cell anemia and vaso-occlusive crisis.

rs1799750 MMP1	Total SCA (n=230)	VOC<2 (n=139)	VOC 2 to 5 (n=52)	VOC>5 (n=39)	VOC≥2 (n=91)	p1	p2	p3
1G/1G	70(30%)	46(33%)	14(27%)	10(26%)	24(26%)	-	-	-
1G/2G	107(47%)	61(44%)	25(48%)	21(54%)	46(51%)	0.5615	0.3877	0.3169
2G/2G	53(23%)	32(23%)	13(25%)	8(20%)	21(23%)	0.6752	1	0.6748
1G/2G + 2G/2G	160(70%)	93(67%)	38(73%)	29(74%)	67(74%)	0.5204	0.4898	0.349
1G	247(54%)	153(55%)	53(51%)	41(53%)	94(52%)	-	-	-
2G	213(46%)	125(45%)	51(49%)	37(47%)	88(48%)	0.5513	0.7958	0.5373
rs2285053 MMP2	Total SCA (n=234)	VOC<2 (n=138)	VOC 2 to 5 (n=55)	VOC>5 (n=41)	VOC≥2 (n=96)	p1	p2	p3
CC	173(74%)	102(74%)	44(80%)	27(66%)	71(74%)	-	-	-
CT	56(24%)	34(25%)	10(18%)	12(29%)	22(23%)	0.4445	0.6064	0.9395
TT	5(2%)	2(1%)	1(2%)	2(5%)	3(3%)	0.606	0.4402	0.6981
CT+TT	61(26%)	36(26%)	11(20%)	14(34%)	25(26%)	0.4817	0.417	0.8858
C	420(86%)	256(87%)	98(89%)	66(80%)	164(85%)	-	-	-
T	66(14%)	38(13%)	12(11%)	16(20%)	28(15%)	0.7054	0.1849	0.6993
rs243865 MMP2	Total SCA (n=235)	VOC<2 (n=137)	VOC 2 to 5 (n=57)	VOC>5 (n=41)	VOC≥2 (n=98)	p1	p2	p3
CC	173(74%)	95(70%)	45(79%)	33(80%)	78(80%)	-	-	-
CT	58(24%)	39(28%)	11(19%)	8(20%)	19(19%)	0.2421	0.3119	0.1356
TT	4(2%)	3(2%)	1(2%)	0 (0%)	1(1%)	-	-	-
CT+TT	62(26%)	42(30%)	12(21%)	8(20%)	20(20%)	0.2365	0.2321	0.1079
C	404(86%)	229(84%)	101(88%)	74(90%)	175(89%)	-	-	-
T	66(14%)	45(16%)	13(12%)	8(10%)	21(11%)	0.2683	0.1898	0.1048
rs17576 MMP9	Total SCA (n=196)	VOC<2 (n=106)	VOC 2 to 5 (n=53)	VOC>5 (n=37)	VOC≥2 (n=90)	p1	p2	p3
AA	101(52%)	50(47%)	27(51%)	24(65%)	51(57%)	-	-	-
AG	80(41%)	48(45%)	22(42%)	10(27%)	32(35%)	0.7703	0.075	0.2087
GG	15(7%)	8(8%)	4(7%)	3(8%)	7(8%)	0.8348	0.9967	1
AG+GG	95(48%)	56(53%)	26(49%)	13(35%)	39(43%)	0.7791	0.0962	0.2371
A	282(72%)	148(70%)	76(72%)	58(78%)	134(74%)	-	-	-
G	110(28%)	64(30%)	30(28%)	16(22%)	46(26%)	0.828	0.2065	0.3657
rs4898 TIMP1	Total SCA (n=235)	VOC<2 (n=138)	VOC 2 to 5 (n=56)	VOC>5 (n=41)	VOC≥2 (n=97)	p1	p2	p3
TT	98(42%)	55(40%)	20(36%)	23(56%)	43(44%)	-	-	-
CT	67(28%)	42(30%)	15(27%)	10(24%)	25(26%)	0.8778	0.2667	0.4964
CC	70(30%)	41(30%)	21(37%)	8(20%)	29(30%)	0.4659	0.1419	0.8744
CT+CC	137(58%)	83(60%)	36(64%)	18(44%)	54(56%)	0.7084	0.0965	0.5819
T	263(56%)	152(55%)	55(49%)	56(68%)	111(57%)	-	-	-
C	207(44%)	124(45%)	57(51%)	26(32%)	83(43%)	0.3396	0.0452	0.7139
rs7501477 TIMP2	Total SCA (n=234)	VOC<2 (n=138)	VOC 2 to 5 (n=55)	VOC>5 (n=41)	VOC≥2 (n=96)	p1	p2	p3
GG	144(62%)	81(59%)	39(71%)	24(59%)	63(66%)	-	-	-
GT	78(33%)	50(36%)	14(25%)	14(34%)	28(29%)	0.1787	0.9668	0.3208
TT	12(5%)	7(5%)	2(4%)	3(7%)	5(5%)	0.789	0.9054	0.8704
GT+TT	90(38%)	57(41%)	16(29%)	17(41%)	33(34%)	0.1571	0.871	0.3497
G	366(78%)	212(77%)	92(84%)	62(76%)	154(80%)	-	-	-
T	102(22%)	64(23%)	18(16%)	20(24%)	38(20%)	0.1796	0.9385	0.4463

rs4898 TIMP1 T vs C allele, p=0.0452, OR=1.757 (1.042-2.962, 95% CI). VOC= Vaso-occlusive crisis, SCA= Sickle cell anemia. p1= VOC <2 vs VOC 2 to 5; p2= VOC<2 vs VOC >5; p3= VOC<2 vs VOC ≥2. P value= Fischer exact test.

Table 3 Frequency of SNPs of *MMPs-TIMPs* genes in patients with sickle cell anemia and risk for IS.

rs1799750 MMP1	Total SCA (n=199)	Normal (n=133)	Cond. (n=43)	HR (n=23)	Cond.+HR (n=66)	p1	p2	p3
1G/1G	57 (29%)	34 (26%)	12 (28%)	11 (48%)	23 (35%)	-	-	-
1G/2G	95 (48%)	68 (51%)	21 (49%)	6 (26%)	27 (41%)	0.914	0.0278	0.1811
2G/2G	47 (23%)	31 (23%)	10 (23%)	6 (26%)	16 (24%)	0.9479	0.5216	0.6471
1G/2G + 2G/2G	142 (71%)	99 (74%)	31 (72%)	12 (52%)	43 (65%)	0.9169	0.054	0.2311
1G	209 (53%)	136 (51%)	45 (52%)	28 (61%)	73 (55%)	-	-	-
2G	189 (47%)	130 (49%)	41 (48%)	18 (39%)	59 (45%)	0.9449	0.2883	0.4973
rs2285053 MMP2	Total SCA (n=212)	Normal (n=137)	Cond. (n=43)	HR (n=23)	Cond.+HR (n=66)	p1	p2	p3
CC	154 (73%)	102 (74%)	33 (77%)	19 (83%)	52 (79%)	-	-	-
CT	43 (20%)	31 (23%)	9 (21%)	3 (13%)	12 (18%)	0.9664	0.4609	0.5884
TT	15 (7%)	4 (3%)	1 (2%)	1 (4%)	2 (3%)	0.7616	0.7138	0.6759
CT+TT	58 (27%)	35 (26%)	10 (23%)	4 (17%)	14 (21%)	0.9196	0.5615	0.6163
C	351 (83%)	235 (86%)	75 (87%)	41 (89%)	116 (88%)	-	-	-
T	73 (17%)	39 (14%)	11 (13%)	5 (11%)	16 (12%)	0.8738	0.7027	0.6688
rs243865 MMP2	Total SCA (n=204)	Normal (n=140)	Cond. (n=41)	HR (n=23)	Cond.+HR (n=64)	p1	p2	p3
CC	147 (72%)	102 (73%)	29 (71%)	16 (70%)	45 (70%)	-	-	-
CT	53 (26%)	34 (24%)	12 (29%)	7 (30%)	19 (30%)	0.7315	0.7693	0.5968
TT	4 (2%)	4 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-	-	-
CT+TT	57 (28%)	38 (27%)	12 (29%)	7 (30%)	19 (30%)	0.9449	0.9397	0.8355
C	347 (85%)	238 (85%)	70 (85%)	39 (85%)	109 (85%)	-	-	-
T	61 (15%)	42 (15%)	12 (15%)	7 (15%)	19 (15%)	0.9248	0.8537	0.9136
rs17576 MMP9	Total SCA (n=187)	Normal (n=123)	Cond. (n=42)	HR (n=22)	Cond.+HR (n=64)	p1	p2	p3
AA	96 (51%)	59 (48%)	24 (57%)	13 (59%)	37 (58%)	-	-	-
AG	79 (42%)	58 (47%)	13 (31%)	8 (36%)	21 (33%)	0.1782	0.464	0.1307
GG	12 (7%)	6 (5%)	5 (12%)	1 (5%)	6 (9%)	0.4421	0.7879	0.6515
AG+GG	91 (49%)	64 (52%)	18 (43%)	9 (41%)	27 (42%)	0.9545	0.8813	0.9186
A	271 (72%)	176 (72%)	61 (73%)	34 (77%)	95 (74%)	-	-	-
G	103 (28%)	70 (28%)	23 (27%)	10 (23%)	33 (26%)	0.9613	0.5486	0.6692
rs4898 TIMP1	Total SCA (n=205)	Normal (n=139)	Cond. (n=43)	HR (n=23)	Cond.+HR (n=66)	p1	p2	p3
TT	85 (41%)	57 (41%)	23 (54%)	5 (22%)	28 (42%)	-	-	-
CT	62 (31%)	42 (30%)	10 (23%)	10 (43%)	20 (31%)	0.3037	0.1393	0.9276
CC	58 (28%)	40 (29%)	10 (23%)	8 (35%)	18 (27%)	0.3638	0.2765	0.9543
CT+CC	120 (59%)	82 (59%)	20 (46%)	18 (78%)	38 (58%)	0.2058	0.1261	0.9675
T	232 (56%)	156 (56%)	56 (65%)	20 (43%)	76 (58%)	-	-	-
C	178 (44%)	122 (44%)	30 (35%)	26 (57%)	56 (42%)	0.1687	0.1499	0.8314
rs7501477 TIMP2	Total SCA (n=204)	Normal (n=138)	Cond. (n=43)	HR (n=23)	Cond.+HR (n=66)	p1	p2	p3
GG	130 (64%)	86 (62%)	29 (67%)	15 (65%)	44 (67%)	-	-	-
GT	63 (31%)	46 (33%)	11 (26%)	6 (26%)	17 (26%)	0.5008	0.7519	0.4258
TT	11 (5%)	6 (5%)	3 (7%)	2 (9%)	5 (7%)	0.8884	0.7984	0.6551
GT+TT	74 (36%)	52 (38%)	14 (33%)	8 (35%)	22 (33%)	0.6687	0.9735	0.6537
G	323 (79%)	218 (79%)	69 (80%)	36 (79%)	105 (80%)	-	-	-
T	85 (21%)	58 (21%)	17 (20%)	10 (21%)	27 (20%)	0.9229	0.9334	1

rs1799750 MMP1, 1G/1G vs 1G/2G $p=0.0278$, OR=3.667 (1.249- 10.76, 95% CI). HR= patients at high risk for IS; Cond. = Patients conditioning for IS; P value= Fischer exact test. TCD= Transcranial Doppler ultrasound; TCD Normal: (less than 170 cm/s); TCD Conditioning: (170-199 cm/s); TCD HR: (≥ 200 cm/s). p1= Normal vs cond.; p2= Normal vs. high risk; p3= Normal vs. Cond.+HR.

Table 4 Fold change of expression essay, analysis by the group.

Clinical events	MMP1 FC	MMP2 FC	MMP7 FC	MMP9 FC	TIMP1 FC	TIMP2 FC
IS	2.23	0.83	0.70	1.49	0.76	0.72
TCD	3.25	1.45	1.57	1.36	1.71	1.32
VOC	1.53	0.96	0.94	2.00	0.90	0.94
CVD	3.32	1.54	1.40	2.02	1.52	1.33

FC= Fold change gene expression; IS= Ischemic stroke; TCD= Transcranial Doppler ultrasound; VOC= Vaso-occlusive crisis; CVD= Cerebrovascular disease.

Fig 1 Heatmap of gene expression of *MMPs-TIMPs* in patients with sickle cell anemia and cerebrovascular disease (a) and vaso-occlusive crisis (b). IS= Ischemic Stroke, Risk IS= Risk of Ischemic Stroke, Control= Control subjects without IS, >5/year= patients who had more than 5 vaso-occlusive events per year, 2-5/year= patients who had 2 to 5 vaso-occlusive events per year, <2/year= patients who had less than 2 vaso-occlusive events per year, MMP1= Metalloproteinase 1, MMP2= Metalloproteinase 2, MMP7= Metalloproteinase 7, MMP9= Metalloproteinase 9, TIMP1= Tissue inhibitor endogenous metalloproteinase 1, TIMP2= Endogenous tissue inhibitor of metalloproteinase 2. Row min= lowest mRNA expression, Row max= highest expression

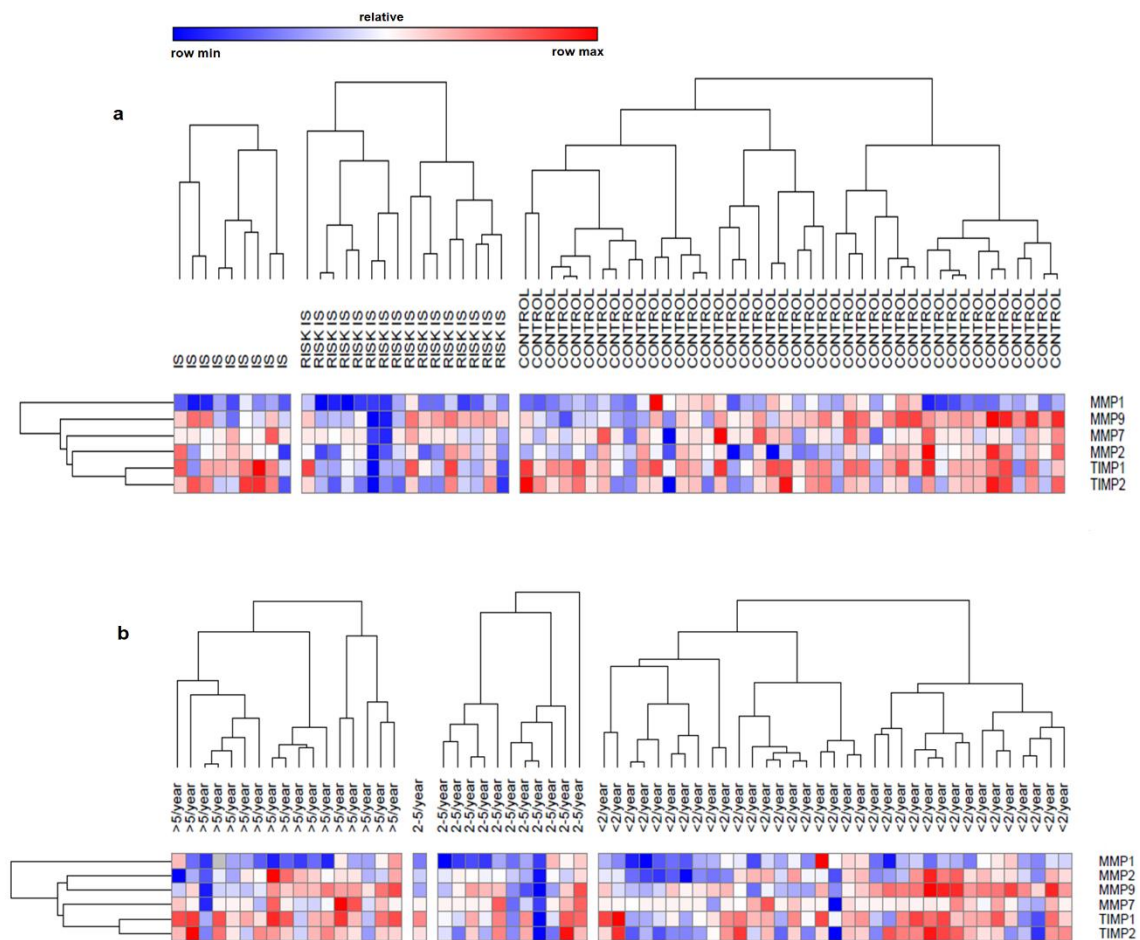


Fig 2 Gene expression of *MMPs-TIMPs* in individuals with vaso-occlusive crisis (a) and cerebrovascular disease (b). >5/year= patients who had more than 5 vaso-occlusive events per year, 2-5/year= patients who had 2 to 5 vaso-occlusive events per year, <2/year= patients who had less than 2 events vaso-occlusives per year, MMP1= Metalloproteinase 1, MMP2= Metalloproteinase 2, MMP7= Metalloproteinase 7, MMP9= Metalloproteinase 9, TIMP1= Endogenous tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP2= Endogenous tissue inhibitor of metalloproteinase 2, CVD+ = patients with cerebrovascular disease , CVD- = patients without cerebrovascular disease, RQ= relative quantification. Statistical test= kruskal wallis. $p < 0.05$ or Fisher's exact test

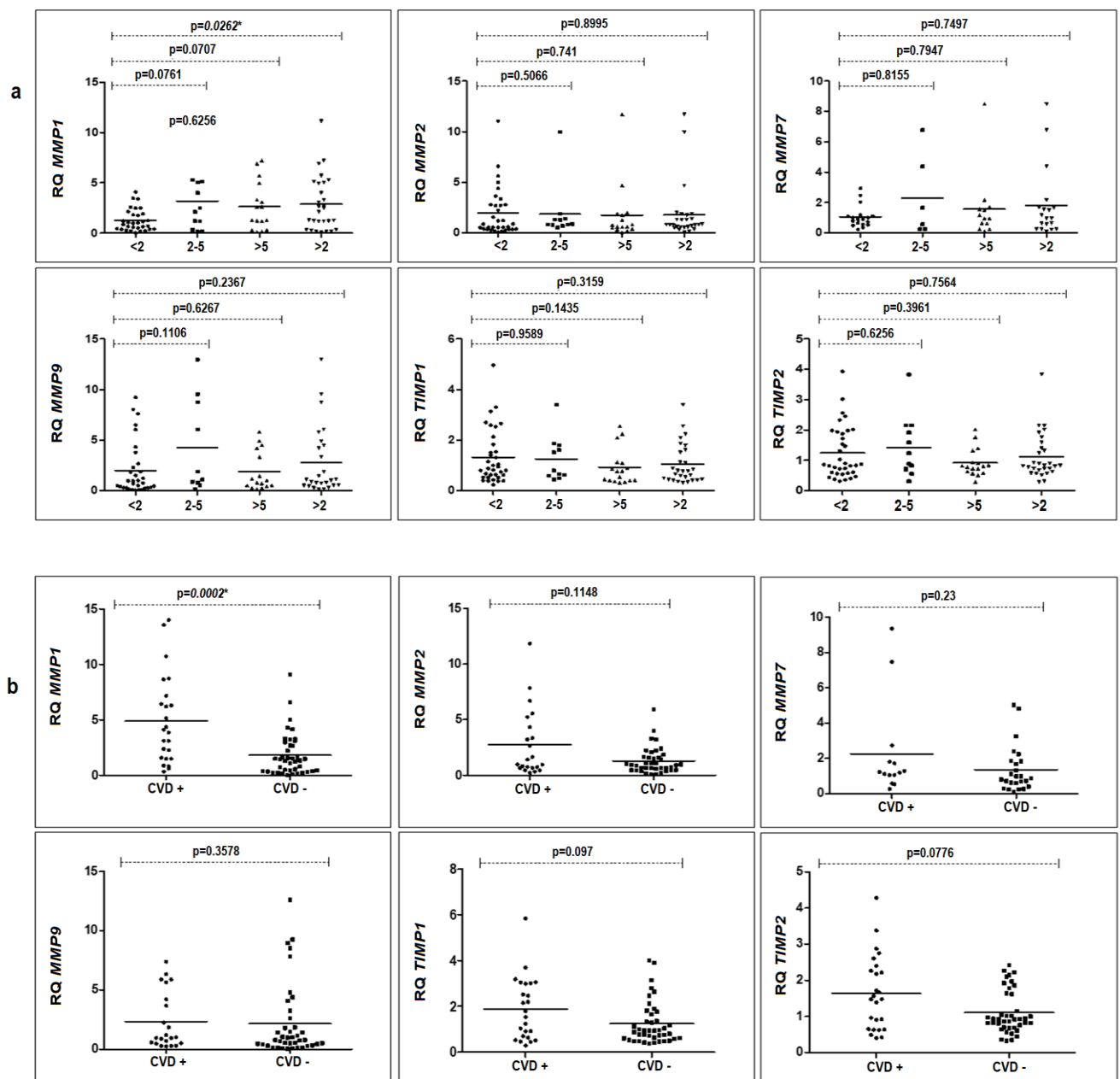


Fig 3 *MMPs-TIMPs* gene expression in individuals with a history of ischemic stroke (a) and increased risk for ischemic stroke, assessed by TCD (b). HR= patients at high risk for IS; Cond. = Conditioning patients for IS; P value= Fisher's exact test. TCD: Normal (less than 170 cm/s); Conditional (170-199 cm/s); high risk (≥ 200 cm/s), MMP1= Metalloproteinase 1, MMP2= Metalloproteinase 2, MMP7= Metalloproteinase 7, MMP9= Metalloproteinase 9, TIMP1= Endogenous tissue metalloproteinase 1 inhibitor, TIMP2= Endogenous tissue metalloproteinase 2 inhibitor. RQ= relative quantification. Statistical test= kruskal wallis or Mann-Whitney. $p < 0.05$

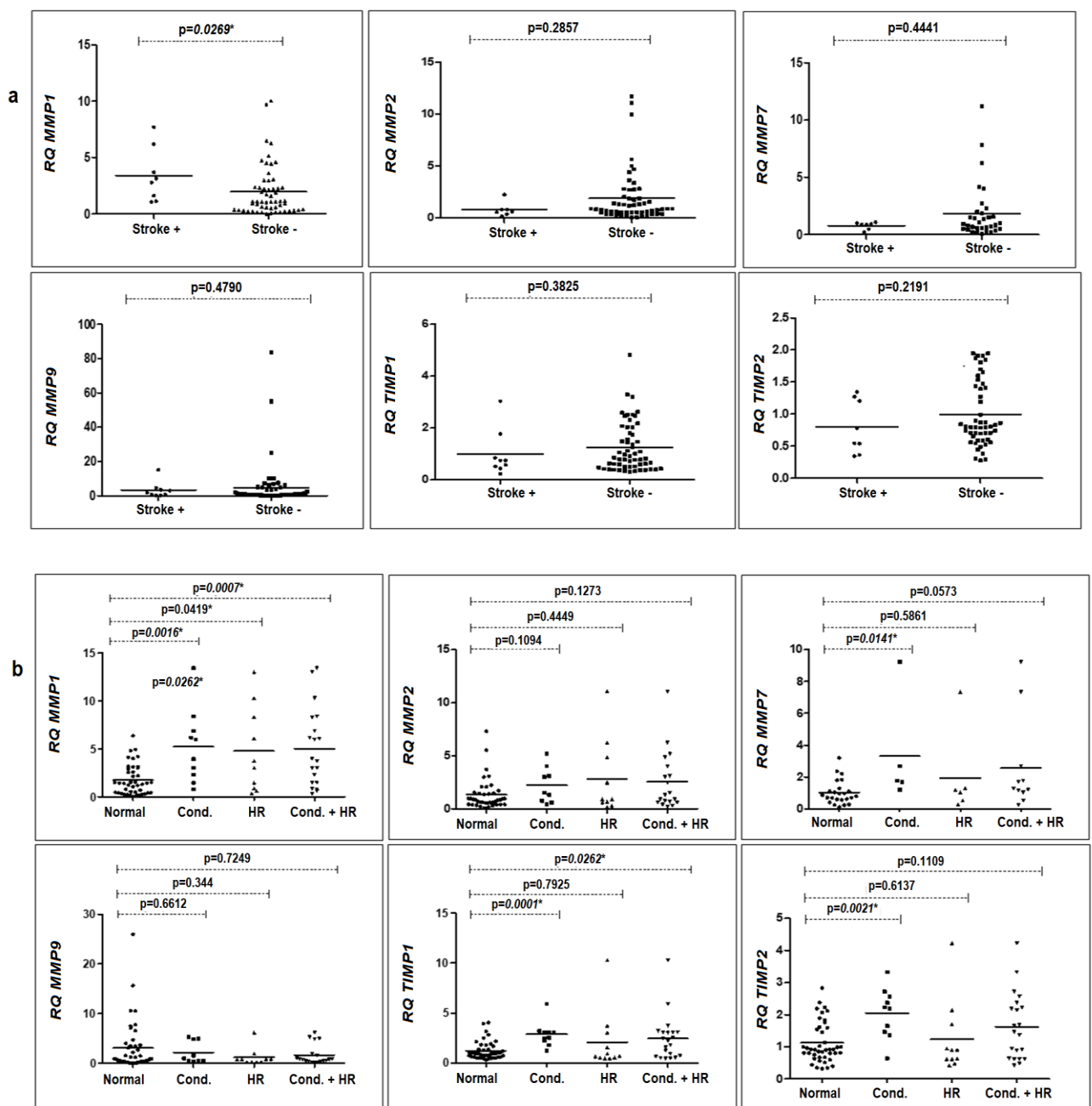


Fig 4 Gene expression of *MMPs-TIMPs* in comparison to SNPs. MMP1= Metalloproteinase 1, MMP2= Metalloproteinase 2, MMP7= Metalloproteinase 7, MMP9= Metalloproteinase 9, TIMP1= Endogenous tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP2= Endogenous tissue inhibitor of metalloproteinase 2. MMP1 1G= major allele, MMP1 2G= minor allele, MMP2 C= major allele, MMP2 T= minor allele, MMP9 A= major allele, MMP9 G= minor allele, TIMP1 T= major allele, TIMP1 C= minor allele, TIMP2 G= major allele, TIMP2 T= minor allele. RQ= relative quantification. Statistical test= kruskal wallis or mann Whitney. $p < 0.05$ or Fisher's exact test

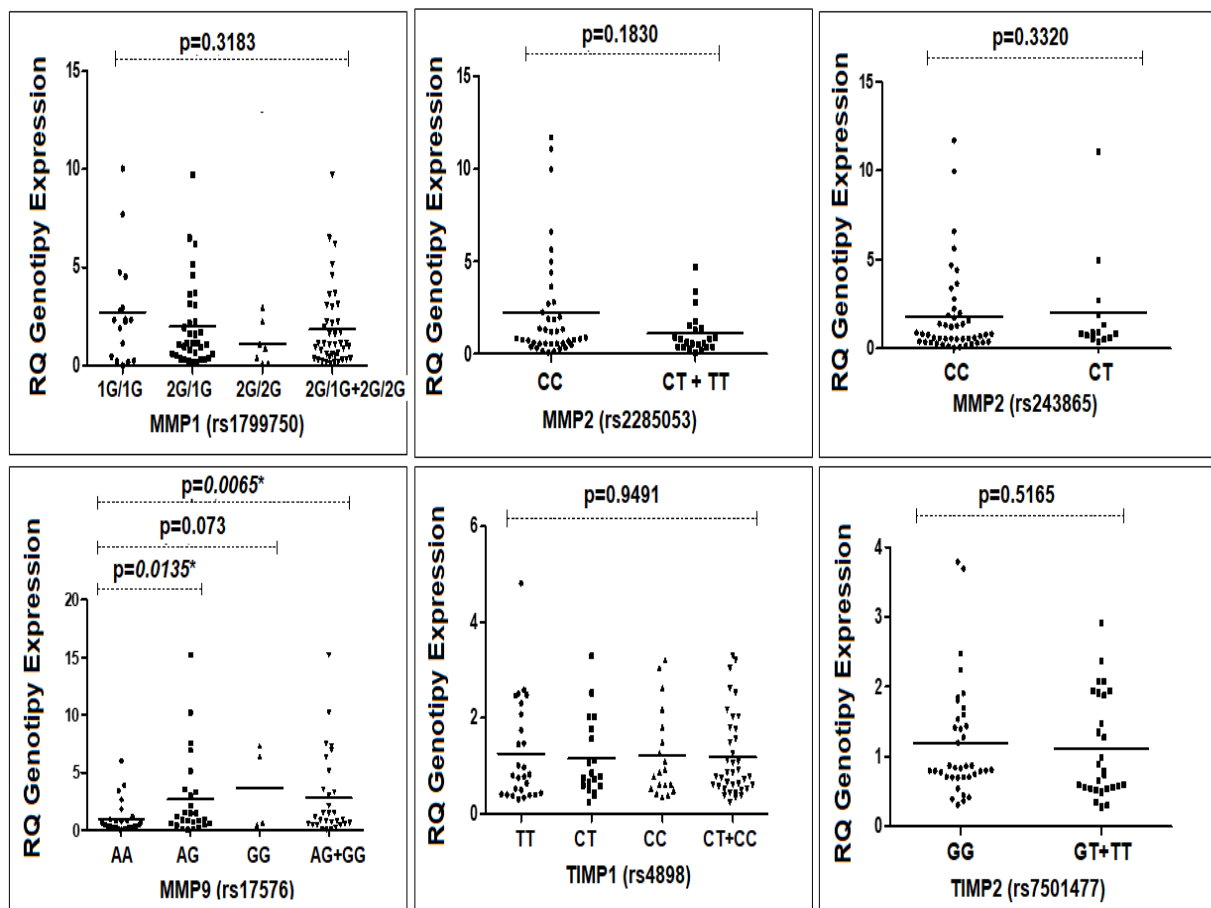


Fig SI 1 Gene expression of *MMPs-TIMPs* in comparison to the use of HU (a) and correlation of *MMPs-TIMPs* genes (b). HU= hydroxyurea, MMP1= Metalloproteinase 1, MMP2= Metalloproteinase 2, MMP7= Metalloproteinase 7, MMP9= Metalloproteinase 9, TIMP1= Endogenous tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP2= Endogenous tissue inhibitor of metalloproteinase 2. RQ= relative quantification. Statistical test= Mann Whitney, $p < 0.05$. spearman correlation test

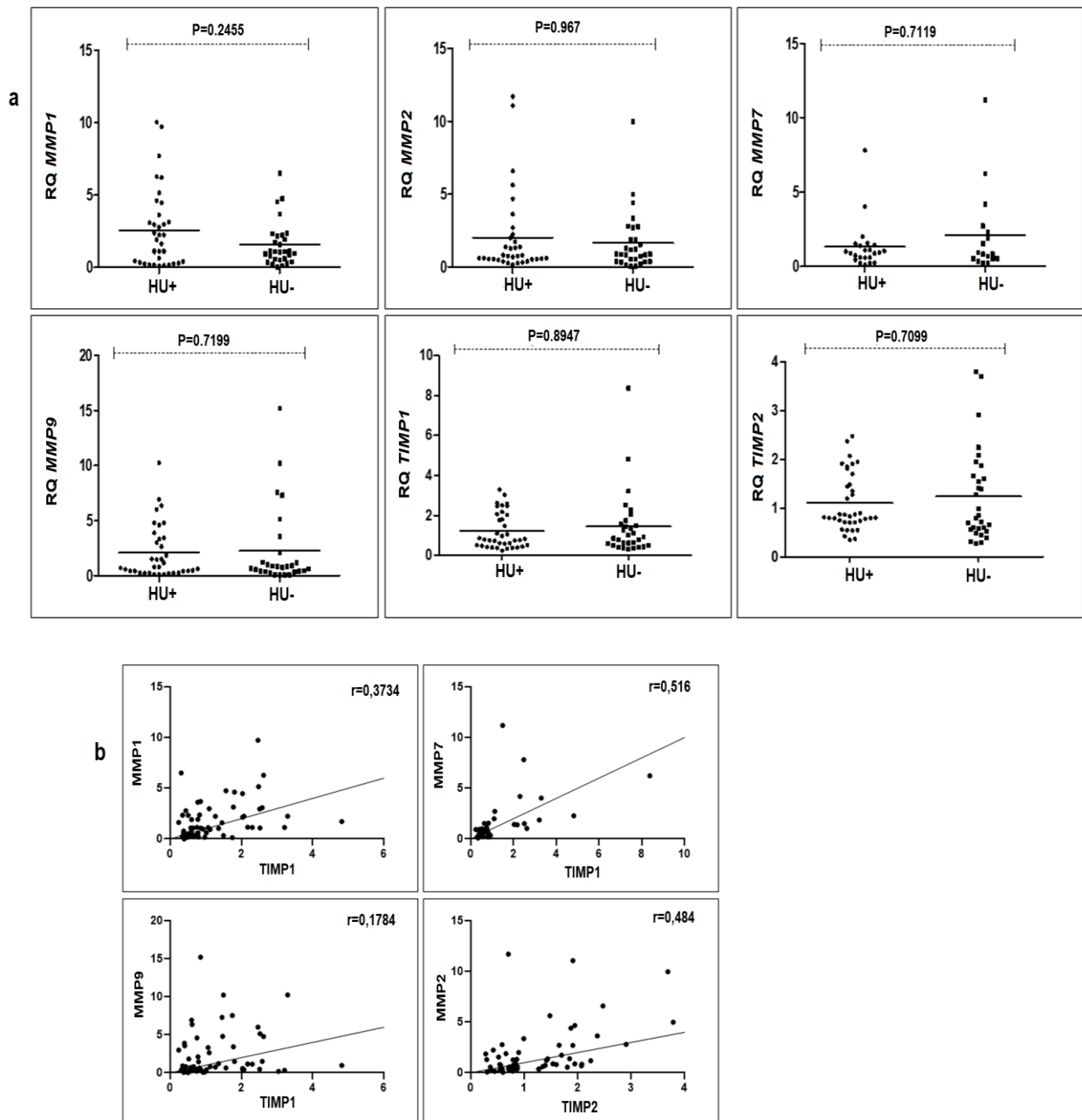


Table SI 1 Hardy-Weinberg equilibrium.

Hardy-Weinberg VOC						
Chr	SnP	A1	A2	O(HET)	E(HET)	P
11	rs1799750	G	A	0.4957	0.4994	0.8956
16	rs243865	T	C	0.2468	0.2414	1
16	rs2285053	T	C	0.2393	0.2423	0.7888
17	rs7501477	T	G	0.3333	0.3409	0.7035
20	rs17576	G	A	0.4082	0.4037	1
23	rs4898	C	T	0.5462	0.4949	0.3536
Hardy-Weinberg CVD						
Chr	SnP	A1	A2	O(HET)	E(HET)	P
11	rs1799750	A	G	0.488	0.4994	0.7819
16	rs243865	T	C	0.2585	0.2533	1
16	rs2285053	T	C	0.2108	0.2333	0.2206
17	rs7501477	T	G	0.3122	0.3315	0.401
20	rs17576	G	A	0.4255	0.4002	0.4676
23	rs4898	C	T	0.566	0.4956	0.1737
Hardy-Weinberg TCD						
Chr	SnP	A1	A2	O(HET)	E(HET)	P
11	rs1799750	G	A	0.5126	0.5	0.7778
16	rs243865	T	C	0.2598	0.2543	1
16	rs2285053	T	C	0.2118	0.2342	0.2215
17	rs7501477	T	G	0.3088	0.3299	0.3943
20	rs17576	G	A	0.4225	0.3991	0.5817
23	rs4898	C	T	0.566	0.4956	0.1737
Hardy-Weinberg IS						
Chr	SnP	A1	A2	O(HET)	E(HET)	P
11	rs1799750	G	A	0.5041	0.4998	1
16	rs243865	T	C	0.243	0.2371	1
16	rs2285053	T	C	0.2419	0.2482	0.6143
17	rs7501477	T	G	0.3347	0.3384	0.8517
20	rs17576	G	A	0.4171	0.415	1
23	rs4898	C	T	0.5397	0.4969	0.3747

CHR= Chromosome; A1= Minor allele; A2= Major allele; O(HET)= Observed heterozygosity; E(HET)= Expected heterozygosity; IS= Ischemic stroke; TCD= Transcranial Doppler ultrasound; VOC= Vaso-occlusive crisis; CVD= Cerebrovascular disease.

Table SI 2 Frequency of SNPs of MMPs-TIMPs genes in patients with sickle cell anemia and CVD.

rs1799750 MMP1	Total SCA (n=200)	CVD+ (n=72)	CVD- (n=128)	p	OR	CI
1G/1G	58(29%)	24(33%)	34(27%)	-	-	-
1G/2G	95(48%)	31(43%)	64(50%)	0.3574	1.457	0.7411 to 2.866
2G/2G	47(23%)	17(24%)	30(23%)	0.7317	1.246	0.5642 to 2.750
1G/2G + 2G/2G	142(71%)	48(67%)	94(73%)	0.395	1.382	0.7378 to 2.590
1G	211(53%)	79(55%)	132(52%)	-	-	-
2G	189(47%)	65(45%)	124(48%)	0.5961	1.142	0.7579 to 1.720
rs2285053 MMP2	Total SCA (n=204)	CVD+ (n=72)	CVD- (n=132)	p	OR	CI
CC	155(76%)	56(78%)	99(75%)	-	-	-
CT	43(21%)	14(19%)	29(22%)	0.8002	1.172	0.5719 to 2.401
TT	6(3%)	2(3%)	4(3%)	0.7692	1.131	0.2007 to 6.376
CT+TT	49(24%)	16(22%)	33(25%)	0.7854	1.167	0.5903 to 2.306
C	353(87%)	126(88%)	227(86%)	-	-	-
T	55(13%)	18(12%)	37(14%)	0.7821	1.141	0.6237 to 2.087
rs243865 MMP2	Total SCA (n=205)	CVD+ (n=69)	CVD- (n=136)	p	OR	CI
CC	148(72%)	50(72%)	98(72%)	-	-	-
CT	53(26%)	19(28%)	34(25%)	0.9178	0.913	0.4734 to 1.761
TT	4(2%)	0 (0%)	4(3%)	-	-	-
CT+TT	57(28%)	19(28%)	38(28%)	0.9173	1.02	0.5339 to 1.950
C	349(85%)	119(86%)	230(85%)	-	-	-
T	61(15%)	19(14%)	42(15%)	0.7619	1.144	0.6369 to 2.054
rs17576 MMP9	Total SCA (n=188)	CVD+ (n=69)	CVD- (n=119)	p	OR	CI
AA	96(51%)	39(57%)	57(48%)	-	-	-
AG	80(43%)	24(35%)	56(47%)	0.1915	1.596	0.8517 to 2.992
GG	12(6%)	6(8%)	6(5%)	0.7562	0.6842	0.2055 to 2.278
AG+GG	92(49%)	30(43%)	62(52%)	0.231	1.515	0.8279 to 2.773
A	272(72%)	102(74%)	170(71%)	-	-	-
G	104(28%)	36(26%)	68(29%)	0.6895	1.133	0.7063 to 1.818
rs4898 TIMP1	Total SCA (n=206)	CVD+ (n=71)	CVD- (n=135)	p	OR	CI
TT	86(42%)	30(42%)	56(41%)	-	-	-
CT	62(30%)	23(32%)	39(29%)	0.9177	0.9084	0.4602 to 1.793
CC	58(28%)	18(26%)	40(30%)	0.7639	1.19	0.5844 to 2.425
CT+CC	120(58%)	41(58%)	79(59%)	0.9666	1.032	0.5766 to 1.848
T	234(57%)	83(58%)	151(56%)	-	-	-
C	178(43%)	59(42%)	119(44%)	0.6987	1.109	0.7348 to 1.673
rs7501477 TIMP2	Total SCA (n=205)	CVD+ (n=72)	CVD- (n=133)	p	OR	CI
GG	130(63%)	45(62%)	85(64%)	-	-	-
GT	64(31%)	22(31%)	42(31%)	0.8986	1.011	0.5383 to 1.898
TT	11(6%)	5(7%)	6(5%)	0.6941	0.6353	0.1837 to 2.197
GT+TT	75(37%)	27(38%)	48(36%)	0.9616	0.9412	0.5195 to 1.705
G	324(79%)	112(78%)	212(80%)	-	-	-
T	86(21%)	32(22%)	54(20%)	0.7421	0.8915	0.5442 to 1.461

SCA= Sickle cell anemia; CVD+= history of Cerebrovascular disease; CVD- = no history of Cerebrovascular disease; OR=Odds Ratio; CI= Confidence interval. P value= Fischer exact test.

Table SI 3 Frequency of SNPs of *MMPs-TIMPs* genes in patients with Sickle Cell Anemia and IS.

rs1799750 MMP1	Total SCA (n=244)	IS+ (n=16)	IS- (n=228)	p	OR	CI
1G/1G	72 (30%)	7 (44%)	65 (29%)	-	-	-
1G/2G	115 (47%)	7 (44%)	108 (47%)	0.5263	1.662	0.5574 to 4.953
2G/2G	57 (23%)	2 (12%)	55 (24%)	0.3041	2.962	0.5906 to 14.85
1G/2G + 2G/2G	172 (70%)	9 (56%)	163 (71%)	0.3132	1.95	0.6970 to 5.458
1G	259 (53%)	21 (66%)	238 (52%)	-	-	-
2G	229 (47%)	11 (34%)	218 (48%)	0.1976	1.749	0.8240 to 3.711
rs2285053 MMP2	Total SCA (n=248)	IS+ (n=16)	IS- (n=232)	p	OR	CI
CC	182 (73%)	12 (75%)	170 (73%)	-	-	-
CT	60 (24%)	3 (19%)	57 (25%)	0.8924	1.341	0.3653 to 4.924
TT	6 (3%)	1 (6%)	5 (2%)	0.8893	0.3529	0.03810 to 3.269
CT+TT	66 (27%)	4 (25%)	62 (27%)	0.8875	1.094	0.3400 to 3.520
C	424 (85%)	27 (84%)	397 (86%)	-	-	-
T	72 (15%)	5 (16%)	67 (14%)	0.94	0.9113	0.3390 to 2.450
rs243865 MMP2	Total SCA (n=251)	IS+ (n=15)	IS- (n=236)	p	OR	CI
CC	186 (74%)	14 (93%)	172 (73%)	-	-	-
CT	61 (24%)	1 (7%)	60 (25%)	0.1732	4.884	0.6284 to 37.95
TT	4 (2%)	0 (0%)	4 (2%)	-	-	-
CT+TT	65 (26%)	1 (7%)	64 (27%)	0.1472	5.209	0.6710 to 40.44
C	433 (86%)	29 (96%)	404 (86%)	-	-	-
T	69 (14%)	1 (3%)	68 (14%)	0.1514	4.881	0.6537 to 36.45
rs17576 MMP9	Total SCA (n=211)	IS+ (n=14)	IS- (n=197)	p	OR	CI
AA	105 (50%)	9 (64%)	96 (49%)	-	-	-
AG	88 (41%)	5 (36%)	83 (42%)	0.6225	1.556	0.5016 to 4.829
GG	18 (9%)	0 (0%)	18 (9%)	-	-	-
AG+GG	106 (50%)	5 (36%)	101 (51%)	0.3964	1.894	0.6126 to 5.854
A	298 (71%)	23 (82%)	275 (70%)	-	-	-
G	124 (29%)	5 (18%)	119 (30%)	0.2416	1.991	0.7389 to 5.362
rs4898 TIMP1	Total SCA (n=251)	IS+ (n=15)	IS- (n=236)	p	OR	CI
TT	103 (41%)	5 (33%)	98 (42%)	-	-	-
CT	70 (28%)	8 (53%)	62 (26%)	0.1881	0.3954	0.1237 to 1.264
CC	78 (31%)	2 (14%)	76 (32%)	0.6876	1.939	0.3659 to 10.27
CT+CC	148 (59%)	10 (67%)	138 (58%)	0.7228	0.7041	0.2333 to 2.125
T	276 (55%)	18 (60%)	258 (55%)	-	-	-
C	226 (45%)	12 (40%)	214 (45%)	0.7034	1.244	0.5861 to 2.641
rs7501477 TIMP2	Total SCA (n=248)	IS+ (n=16)	IS- (n=232)	p	OR	CI
GG	153 (62%)	9 (56%)	144 (62%)	-	-	-
GT	83 (33%)	6 (38%)	77 (33%)	0.9001	0.8021	0.2752 to 2.338
TT	12 (5%)	1 (6%)	11 (5%)	0.7752	0.6875	0.07964 to 5.935
GT+TT	95 (38%)	7 (44%)	88 (38%)	0.8436	0.7857	0.2825 to 2.185
G	389 (78%)	24 (75%)	365 (79%)	-	-	-
T	107 (22%)	8 (25%)	99 (21%)	0.7909	0.8137	0.3546 to 1.867

SCA= Sickle cell anemia; IS+= patients with a history of ischemic stroke; IS-= patients with no history of ischemic stroke. OR= Ration Odds; CI= Confidence interval. P value= Fischer exact test.

APÊNDICE C – PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DURANTE O CURSO

RELACIONADOS AO TEMA DA TESE:

FREIRE, A. K. da S.; BELMONT, T. F. de M.; **Ó, K. P.** do; SILVA, A. S. da; FARIAS, I. C. C.; CARVALHO, M. de F. A. A.; SANTIAGO, E. J. P.; CAVALCANTI, M. do S. de M. Nursing care in pain management in children with sickle cell anemia: na integrative review. Research, Society and Development, [S. l.], v. 9, n. 5, p. e182953353, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i5.3353>

FARIAS, I. C. C.; MENDONÇA-BELMONT, T. F.; MOURA, P. M. M. F.; DOMINGOS, I. F.; FALCÃO, D. A.; ARCANJO, G. S.; HATZLHOFER, B. L. D.; **Ó, K. P. do**; FARIAS, J. V. C.; SILVA, A. S. da; VASCONCELOS, L. R. S.; ARAÚJO, A. da S.; ANJOS, A. C. M. dos; LUCENA-ARAÚJO, A. R.; CAVALCANTI, M. do S. de M.; BEZERRA, M. A. C. MBL2 gene polymorphisms are not related to the occurrence of cerebrovascular disease in sickle cell anemia. Research, Society and Development, [S. l.], v. 9, n. 7, p. e439974240, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4240>

Ó, K. P. do; MENDONÇA-BELMONT, T. F. de; FARIAS, I. C. C.; SILVA, A. S. da.; FREIRE, A. K. da S.; MOURA, P. M. M. F. de ; VASCONCELOS, L. R. S. .; ARAÚJO, A. da S. .; ARCANJO, G. da S. .; FALCÃO, D. A. .; HATZLHOFER, B. L. D. .; LUCENA-ARAÚJO , A. R. . .; BEZERRA, M. A. C. .; CAVALCANTI, M. do S. de M. . LGALS3 +191A and +292C polymorphisms are associated with a reduction in serum gal-3 levels, but not with the clinical events of individuals with sickle cell anemia. Research, Society and Development, [S. l.], v. 9, n. 9, p. e442997314, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7314>

NÃO RELACIONADOS AO TEMA DA TESE:

de Araújo Melo L, da Silveira MMBM, de Vasconcellos Piscoya IC, Brasileiro VAE, Farias ICC, **do Ó KP**, Roncal CGP, Lima RE, Filho DCS, Vasconcelos LRS. Expression of microRNAs (133b and 138) and Correlation with Echocardiographic Parameters in Patients with Alcoholic Cardiomyopathy. Microna. 2020;9(2):112-120. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/2211536608666190716151900>

da Silveira MMBM, Melo LA, Gomes FMF, Andrade LJCBD, Serur IP, Piscoya ICV, Gueiros RM, ***Palmeira do Ó K***, de Lima RE, Brasileiro VAE, Vasconcelos LRS, Sobral Filho DC. Polymorphisms of CYP2C9*2, CYP2C9*3 and VKORC1 genes related to time in therapeutic range in patients with atrial fibrillation using warfarin. *Appl Clin Genet*. 2019 Aug 2;12:151-159. doi: <http://dx.doi.org/10.2147/TACG.S197316>

FREIRE, A. K. da S.; BELMONT, T. F. de M.; ***DO Ó, K. P.***; SILVA, A. S. da; FARIAS, I. C. C.; CARVALHO, M. de F. A. A.; SANTIAGO, E. J. P.; CAVALCANTI, M. do S. de M.; MEDEIROS, Z. M. de; VASCONCELOS, L. R. S. Palliative care in people with hepatocellular carcinoma: an integrative review. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 9, n. 7, p. e248974125, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4125>

da Silva AS, Carvalho TL, ***do Ó KP***, da Nóbrega DN, Dos Santos Souza R, da Silva Lima VF, Farias ICC, de Mendonça Belmont TF, de Mendonça Cavalcanti MDS, de Barros Miranda-Filho D. Association of the polymorphisms of the genes APOC3 (rs2854116), ESR2 (rs3020450), HFE (rs1799945), MMP1 (rs1799750) and PPARG (rs1801282) with lipodystrophy in people living with HIV on antiretroviral therapy: a systematic review. *Mol Biol Rep*. 2020 Jun;47(6):4779-4787. doi: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-020-05441-3>

Silva ASD, Cavalcanti MDSM, Belmont TFM, Ximenes RAA, Silva AVD, Nóbrega DND, Souza RDS, Farias ICC, ***do Ó KP***, Vasconcelos LRS, Diniz GTN, Miranda-Filho DB. The 1G/1G+1G/2G Genotypes of MMP1 rs1799750 Are Associated with Higher Levels of MMP-1 and Are Both Associated with Lipodystrophy in People Living with HIV on Antiretroviral Therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2021 May;37(5):399-406. doi: <http://dx.doi.org/10.1089/AID.2020.0237>

da Silva Freire AK, Furtado de Mendonça Belmont T, Pinto Santiago EJ, Cristina Cordeiro Farias I, ***Palmeira do Ó K***, Soares da Silva A, Richardson Silva Vasconcelos L. Potential role of circulating miR-21 in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2022 Nov;22(11):1037-1052. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/14737159.2022.2145189>

APÊNDICE D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Elaborado de acordo com a Resolução 466/2012-CNS/CONEP)

Convidamos V.Sa. a participar da pesquisa “**Avaliação de polimorfismos e expressões de genes da imunidade inata nas manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme**”, sob responsabilidade do pesquisador Kleyton Palmeira do Ó, que tem por objetivo:

- Avaliar a influência dos genes (que é um componente do DNA no sangue) das metaloproteinases (*MMPs*) e seus inibidores (*TIMPs*), nos eventos vaso-oclusivos (fechamento do vaso sanguíneo) em crianças com anemia falciforme (AF).

Para a realização deste trabalho serão utilizados os seguintes métodos:

Serão avaliadas crianças com Anemia Falciforme entre 1 a 16 anos de idade participantes da triagem neonatal, diagnosticadas no Hemocentro de Pernambuco (HEMOPE). Os dados clínicos, referentes aos pacientes com Anemia Falciforme, serão coletados de prontuários padronizados disponibilizados pelo arquivo médico da Fundação HEMOPE. Além disso, haverá a coleta de 4ml de sangue dos pacientes participantes da pesquisa com o objetivo que extrair o DNA das amostras e analisar se há variação na forma desse DNA. As amostras serão armazenadas no Laboratório de Biologia Molecular de Vírus (LBMV) localizado no Instituto do Fígado e Transplante de Pernambuco (IFP) da UPE para fazer as análises. Dessa forma, serão respeitadas as normas da resolução 441 de 2011, a qual rege as diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvem o armazenamento de material biológico humano.

É importante mencionar que após a conclusão da pesquisa, este material coletado será destruído no LBMV da UPE, não restando nada que venha a comprometê-lo agora ou futuramente.

Será garantida ao participante a possibilidade de acesso ao conhecimento dos resultados obtidos com a utilização do seu material biológico e às orientações quanto as suas implicações através do contato com os pesquisadores.

Quanto aos **riscos e desconfortos**, a metodologia utilizada para esta coleta de dados, até a presente fase e diante dos procedimentos utilizados, nos mostra que o que pode vir a ocorrer, durante ou após o trabalho, é a possibilidade de surgir algum desconforto tais como dor, hematoma ou outro desconforto no local da coleta de sangue. Raramente desmaios e infecções no local da punção podem ocorrer. Para evitar os aparentes riscos é necessária uma boa prática de biossegurança durante o procedimento. Caso haja o aparecimento de hematoma, é necessário fazer uma compressa de gelo por quinze minutos a cada hora, durante as primeiras seis horas, caso o hematoma persista ou se houver qualquer outra reação ou dor local, o paciente deve entrar em contato com o pesquisador para que sejam tomadas as devidas providências.

Os **benefícios** esperados com o resultado desta pesquisa são: possibilitar um maior entendimento a respeito das variações das formas dos genes das metaloproteinases (*MMPs*) e seus inibidores (*TIMPs*), com os eventos de fechamento do vaso que normalmente acometem pessoas portadoras de Anemia Falciforme; utilizar estes genes como possíveis marcadores para identificar precocemente os eventos vaso-oclusivos, possibilitando, com isso, um melhor direcionamento no tratamento de pessoas que possuem a anemia falciforme; A rápida identificação do fechamento dos vasos sanguíneos é de suma importância, principalmente, porque este evento é a maior causa de morbidade e mortalidade na anemia falciforme, podendo diminuir, ainda, a oclusão dos vasos sanguíneos, a isquemia ou infarto em vários tecidos, dores de forte intensidade, progressivos danos aos órgãos, ossos, articulações, vasos cerebrais, destruição progressiva do baço e a susceptibilidade aumentada a infecções.

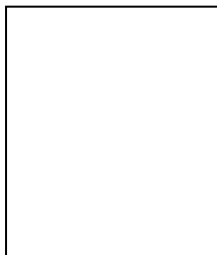
O senhor(a) terá os seguintes **direitos**: a garantia de esclarecimento e resposta a qualquer

pergunta; a liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento sem prejuízo para si **ou para seu tratamento (se for o caso)**; a garantia de privacidade à sua identidade e do sigilo de suas informações; a garantia de que caso haja algum dano a sua pessoa (ou o dependente), os prejuízos serão assumidos pelos pesquisadores ou pela instituição responsável inclusive acompanhamento médico e hospitalar. Caso haja gastos adicionais serão absorvidos pelo pesquisador responsável.

No caso de **dúvidas e esclarecimentos** procurar os pesquisadores através do e-mail ou por telefone: Kleyton palmeira do Ó (81) 98589-0901 – e-mail: Kleyton.palmeira-pe@hotmail.com; Dra. Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti Profa. (81) 99975-6644 - socorro.cavalcanti@upe.br; Também participam desta pesquisa:, Dr. Aderson da Silva Araújo (81) 99976-5136 - aderson@hotmail.com.br, Dra. Taciana Furtado de Mendonça Belmont (81) 99665-1404 - tacionafm@hotmail, Andreia Soares da Silva (81) 97911-8433 - andreiasoares.upe@hotmail.com, Dr^a. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura (81) 99998-9333 - patricia.moura@upe.br, Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos (81) 99645-2018 - luydson.vasconcelos@cpqam.fiocruz.br, Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (81) 99800-8105 macbezerraufpe@gmail.com, Isabela Cristina Cordeiro Farias (81) 99359-6556 - Isabela.c.farias@hotmail.com, Ana Karla da Silva Freire (87) 9955-3463 – akarlasf@hotmail.com). Caso suas dúvidas não sejam resolvidas pelos pesquisadores ou seus direitos sejam negados recorrer ao Comitê de Ética do Complexo Hospitalar HUOC/PROCAPE, localizado no Pavilhão Ovídio Montenegro-1º andar-Rua Arnóbio Marques, 310- Santo Amaro-50100-130- Recife-PE. Fone/Fax: (81)31841271- Email: cep_huoc.procape@upe.br).

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Comprovo ter assimilado todas as informações descritas anteriormente e, de forma livre e esclarecida, evidencio meu consentimento em participar desta pesquisa. Sendo assim, assino esse documento em duas vias, em que uma ficará em minha posse e a outra com o pesquisador responsável.



Impressão do dedo
polegar, caso não saiba assinar

Assinatura do participante

Kleyton Palmeira do Ó - Pesquisadora responsável

____/____/_____
Data

APÊNDICE E - TERMO DE ASSENTIMENTO

(Elaborado de acordo com a Resolução 466/2012-CNS/CONEP)

Prezado(a) convidamos você a participar da pesquisa “**Avaliação de polimorfismos e expressões de genes da imunidade inata nas manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme**”, sob responsabilidade do pesquisador Kleyton Palmeira do Ó, que tem por objetivo:

- Avaliar a influência dos genes (que é um componente do DNA no sangue) das metaloproteinases (*MMPs*) e seus inibidores (*TIMPs*), nos eventos vaso-oclusivos (fechamento do vaso sanguíneo) em crianças com anemia falciforme (AF).

Para a realização deste trabalho serão utilizados os seguintes métodos:

Serão avaliadas crianças com Anemia Falciforme entre 1 a 16 anos de idade participantes da triagem neonatal, diagnosticadas no Hemocentro de Pernambuco (HEMOPE). Os dados clínicos, referentes aos pacientes com Anemia Falciforme, serão coletados de prontuários padronizados disponibilizados pelo arquivo médico da Fundação HEMOPE. Além disso, haverá a coleta de 4ml de sangue dos pacientes participantes da pesquisa com o objetivo que extrair o DNA das amostras e analisar se há variação na forma desse DNA. As amostras serão armazenadas no Laboratório de Biologia Molecular de Vírus (LBMV) localizado no Instituto do Fígado e Transplante de Pernambuco (IFP) da UPE para fazer as análises. Dessa forma, serão respeitadas as normas da resolução 441 de 2011, a qual rege as diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvem o armazenamento de material biológico humano.

É importante mencionar que após a conclusão da pesquisa, este material coletado será destruído no LBMV da UPE, não restando nada que venha a comprometê-lo agora ou futuramente.

Será garantida ao participante a possibilidade de acesso ao conhecimento dos resultados obtidos com a utilização do seu material biológico e às orientações quanto as suas implicações através do contato com os pesquisadores.

Quanto aos **riscos e desconfortos**, a metodologia utilizada para esta coleta de dados, até a presente fase e diante dos procedimentos utilizados, nos mostra que o que pode vir a ocorrer, durante ou após o trabalho, é a possibilidade de surgir algum desconforto tais como dor, hematoma ou outro desconforto no local da coleta de sangue. Raramente desmaios e infecções no local da punção podem ocorrer. Para evitar os aparentes riscos é necessária uma boa prática de biossegurança durante o procedimento. Caso haja o aparecimento de hematoma, é necessário fazer uma compressa de gelo por quinze minutos a cada hora, durante as primeiras seis horas, caso o hematoma persista ou se houver qualquer outra reação ou dor local, o paciente deve entrar em contato com o pesquisador para que sejam tomadas as devidas providências.

Os **benefícios** esperados com o resultado desta pesquisa são: possibilitar um maior entendimento a respeito das variações das formas dos genes das metaloproteinases (*MMPs*) e seus inibidores (*TIMPs*), com os eventos de fechamento do vaso que normalmente acometem pessoas portadoras de Anemia Falciforme; utilizar estes genes como possíveis marcadores para identificar precocemente os eventos vaso-oclusivos, possibilitando, com isso, um melhor direcionamento no tratamento de pessoas que possuem a anemia falciforme; A rápida identificação do fechamento dos vasos sanguíneos é de suma importância, principalmente, porque este evento é a maior causa de morbidade e mortalidade na anemia falciforme, podendo diminuir, ainda, a oclusão dos vasos sanguíneos, a isquemia ou infarto em vários tecidos, dores de forte intensidade, progressivos danos aos órgãos, ossos, articulações, vasos cerebrais, destruição progressiva do baço e a susceptibilidade aumentada a infecções.

Como participante, terá os seguintes **direitos**: a garantia de esclarecimento e resposta a qualquer

pergunta; a liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento sem prejuízo para si **ou para seu tratamento (se for o caso)**; a garantia de privacidade à sua identidade e do sigilo de suas informações; a garantia de que caso haja algum dano a sua pessoa (ou o dependente), os prejuízos serão assumidos pelos pesquisadores ou pela instituição responsável inclusive acompanhamento médico e hospitalar. Caso haja gastos adicionais serão absorvidos pelo pesquisador responsável.

No caso de **dúvidas e esclarecimentos** procurar os pesquisadores através do e-mail ou por telefone: Kleyton palmeira do Ó (81) 98589-0901 – e-mail: Kleyton.palmeira-pe@hotmail.com; Dra. Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti Profa. (81) 99975-6644 - socorro.cavalcanti@upe.br; Também participam desta pesquisa:, Dr. Aderson da Silva Araújo (81) 99976-5136 - aderson@hotmail.com.br, Dra. Taciana Furtado de Mendonça Belmont (81) 99665-1404 - tacionafm@hotmail, Andreia Soares da Silva (81) 97911-8433 - andreiasoares.upe@hotmail.com, Dr^a. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura (81) 99998-9333 - patricia.moura@upe.br, Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos (81) 99645-2018 - luydson.vasconcelos@cpqam.fiocruz.br, Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (81) 99800-8105 macbezerraufpe@gmail.com, Isabela Cristina Cordeiro Farias (81) 99359-6556 - Isabela.c.farias@hotmail.com, Ana Karla da Silva Freire (87) 9955-3463 – akarlasf@hotmail.com). Caso suas dúvidas não sejam resolvidas pelos pesquisadores ou seus direitos sejam negados recorrer ao Comitê de Ética do Complexo Hospitalar HUOC/PROCAPE, localizado no Pavilhão Ovídio Montenegro-1º andar-Rua Arnóbio Marques, 310- Santo Amaro-50100-130- Recife-PE. Fone/Fax: (81)31841271- Email: cep_huoc.procape@upe.br).

Assentimento Livre e Esclarecido

Eu _____ aceito participar da pesquisa **“Avaliação de polimorfismos e expressões de genes da imunidade inata nas manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme”**, que tem o objetivo a identificação de alterações genéticas na anemia falciforme. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Sendo assim, assino esse documento em duas vias de igual teor, em que uma ficará em minha posse e a outra com o pesquisador responsável.

Local, ____ de _____ de _____.

Assinatura do menor

Assinatura do pesquisador

ANEXO A - CARTA DE ACEITE DO ARTIGO ORIGINAL

09/01/2023 19:20

[View Letter](#)

Date: 09 Jan 2023
To: "Luydson Vasconcelos" luydson.vasconcelos@fiocruz.br
From: "Molecular Biology Reports (MOLE)" ranjith.ayyapan@springer.com
Subject: Decision on your manuscript #MOLE-D-22-05792R2

Dear Dr Vasconcelos:

I am pleased to inform you that your manuscript, "Polymorphisms and gene expression of Metalloproteinases and their inhibitors associated with cerebral ischemic stroke in young patients with sickle cell anemia" has been accepted for publication in Molecular Biology Reports.

Your article will now be handed over to the production department and typeset within the next three to four weeks. Then you will receive the proofs for correction.

When you receive the proofs for your article, please correspond with your co-authors to check very carefully that all names and affiliations are correct, as these cannot be corrected once the article is published.

Please remember to always include your manuscript number, #MOLE-D-22-05792R2, whenever inquiring about your manuscript.

Thank you.

Sincerely yours,
Gillian Knight
Editor-in-Chief
Molecular Biology Reports

Ativa

ANEXO B - PARECER COMITÊ DE ÉTICA

COMPLEXO HOSPITALAR
HUOC/PROCAPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS E EXPRESSÕES DE GENES DA IMUNIDADE INATA NAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES COM ANEMIA

Pesquisador: Kleyton Palmeira do Ó

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 94534218.0.0000.5192

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.102.335

Apresentação do Projeto:

Assim dispõe o Resumo apresentado pelos pesquisadores, in verbis: "Anemia falciforme (AF) é uma doença genética hereditária causada por uma mutação pontual, substituindo o aminoácido ácido glutâmico pela valina na posição 6 da cadeia -globina, que substitui a síntese da hemoglobina normal HbA pela hemoglobina da AF a HbS. Em baixas tensões de oxigênio ocorre a polimerização da HbS, tornando o eritrócito rígido e em forma de foice, diminuindo sua flexibilidade e passagem pela microcirculação, levando a fenômenos vasooclusivos que juntamente com a hemólise originam a maioria dos sinais e sintomas presentes nestes pacientes tais como: crises algicas, dactilite, síndrome torácica aguda (STA), sequestro esplênico agudo (SEA), retinopatia, insuficiência renal crônica, auto esplenectomia, acidente vascular encefálico (AVE), problemas cognitivos, priapismo, infecções, sendo a crise vaso-oclusiva (CVO) a maior causa de morbidade e mortalidade na AF principalmente em crianças. Pela AF ser uma doença crônica de caráter inflamatório e com ocorrência de alterações vasculares, diversas moléculas que atuam em processos biológicos, como a adesão, proliferação e diferenciação celular, regulação da inflamação, apoptose e remodelamento vascular, tais como as metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores TIMPs, proteínas que atuam nesses processos, podendo estar envolvidas no processo fisiopatológico da AF. O objetivo deste estudo será, avaliar a influência dos genes das metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) nos eventos vasooclusivos (EVO) em crianças

Endereço: Rua Arnóbio Marques, 310

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.100-130

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3184-1271

Fax: (81)3184-1271

E-mail: cep_huoc.procape@upe.br

COMPLEXO HOSPITALAR
HUOC/PROCAPE



Continuação do Parecer: 3.102.335

com anemia falciforme (AF). O estudo de polimorfismos em genes que codificam proteínas que poderiam estar envolvidas em processos biológicos frequentes nos eventos clínicos da AF, como as MMPs e seus inibidores TIMPs, podem vir a ser utilizados como biomarcadores para a identificação precoce de uma complicação clínica na AF, o que por sua vez auxiliaria os profissionais da saúde no melhor manejo clínico, melhorando a qualidade de vida e sobrevida destes pacientes.”

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com os proponentes da presente pesquisa, esta tem como objetivos:

“- Objetivo Primário:

Avaliar a influência dos genes das metaloproteinasas (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) nos eventos vasooclusivos (EVO) em crianças com anemia falciforme (AF).

Objetivo Secundário:

- Caracterizar a população estudada em relação às variáveis características clinico-laboratoriais;
- Determinar as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos dos genes MMP2-1306 C/T (rs243864), MMP9-1562 C/T (rs3918242), TIMP1+372 C/T (rs4898) e TIMP2-418 G/C (rs7501477) em pacientes com AF;
- Verificar a existência de associação entre as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos dos genes MMP2 -1306 C/T, MMP9 - 1562 C/T, TIMP1 +372 C/Te TIMP2 -418 G/C com a frequência de EVO em pacientes com AF;
- Quantificar a expressão dos genes MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 nas células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de pacientes com AF;
- Verificar a existência de associação entre a expressão dos genes MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 com a frequência de EVO em pacientes com AF;
- Verificar a existência de associação entre os a expressão dos genes MMP2, MMP9, TIMP1 e TIMP2 com a frequência de EVO em pacientes com AF;
- Verificar a existência de associação entre os polimorfismos e expressões dos genes MMP2, MMP9, TIMP1

Endereço: Rua Arnóbio Marques, 310

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.100-130

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3184-1271

Fax: (81)3184-1271

E-mail: cep_huoc.procape@upe.br

COMPLEXO HOSPITALAR
HUOC/PROCAPE



Continuação do Parecer: 3.102.335

e TIMP2 em pacientes com AF;

- Avaliar a correlação entre a expressão dos genes TIMP se a expressão dos genes MMPs em pacientes com AF;
- Avaliar a razão da expressão gênica MMP2/TIMP2 e MMP9/TIMP1 em pacientes com AF;
- Verificar a expressão proteica das MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em PBMCs de pacientes com AF submetidos à ambientes normais e hipóxicos;
- Verificar a existência de associação entre a expressão proteica das MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 com a frequência de EVO em pacientes com AF;
- Verificar a existência de associação entre os polimorfismos dos genes MMPs e TIMP se a expressão proteica das MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 de pacientes com AF."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O procedimento para coletar o material da pesquisa e a retirada de uma única coleta de 10 ml de sangue por punção venosa, por profissionais habilitados e treinados para tal, entretanto um risco de maior gravidade para o paciente seria a não coleta por dificuldade em puncionar a veia do paciente e esse fato pode representar um pequeno risco de ocasionar uma pequena mancha roxa no paciente no local da punção, mesmo que esse acontecimento seja muito raro de acontecer.

Benefícios:

Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, a identificação de alterações genéticas na anemia falciforme permitirá a detecção precoce dos eventos vaso-oclusivos em pacientes com anemia falciforme, levando a melhoria do serviço prestado e a melhora da qualidade de vida dos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo de relevância clínica e social, que pretende auxiliar os profissionais da saúde no melhor manejo clínico, qualidade de vida e sobrevida de pacientes com anemia falciforme.

Projeto apresenta viabilidade para ser aplicado e não oferece óbice ético.

Endereço: Rua Arnóbio Marques, 310

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.100-130

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3184-1271

Fax: (81)3184-1271

E-mail: cep_huoc.procape@upe.br

**COMPLEXO HOSPITALAR
HUOC/PROCAPE**



Continuação do Parecer: 3.102.335

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

ARESENTADOS

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado de conformidade com as Resoluções 466/12, do CNS-MS, não havendo nenhum impedimento ético para realização do mesmo, devendo o pesquisador enviar relatório parcial, caso no decorrer da pesquisa venha a serem demonstrados fatos relevantes e resultados parciais de seu desenvolvimento; e um relatório final a ser apresentado após o encerramento da pesquisa, totalizando seus resultados.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado de conformidade com as Resoluções 466/12, do CNS-MS, não havendo nenhum impedimento ético para realização do mesmo, devendo o pesquisador enviar relatório parcial, caso no decorrer da pesquisa venha a serem demonstrados fatos relevantes e resultados parciais de seu desenvolvimento; e um relatório final a ser apresentado após o encerramento da pesquisa, totalizando seus resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1156533.pdf	18/12/2018 20:43:44		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO.pdf	18/12/2018 20:42:39	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	18/12/2018 20:42:21	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCEP.pdf	18/12/2018 20:42:06	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito
Outros	declaracao_de_custo.pdf	24/11/2018 19:05:41	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito
Outros	AdersonAraujo.pdf	20/09/2018 09:48:51	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito
Outros	AnaFreire.pdf	20/09/2018	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito

Endereço: Rua Arnóbio Marques, 310
Bairro: Santo Amaro **CEP:** 50.100-130
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)3184-1271 **Fax:** (81)3184-1271 **E-mail:** cep_huoc.procape@upe.br

COMPLEXO HOSPITALAR
HUOC/PROCAPE



Continuação do Parecer: 3.102.335

Outros	AnaFreire.pdf	09:48:04	Ó	Aceito
Outros	AndreiaSilva.pdf	20/09/2018 09:47:48	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito
Outros	IsabelaFarias.pdf	20/09/2018 09:47:31	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito
Outros	KleytonPalmeira.pdf	20/09/2018 09:47:14	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito
Outros	LuydsonVasconcelos.pdf	20/09/2018 09:46:56	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito
Outros	MarcosBezerra.pdf	20/09/2018 09:46:37	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito
Outros	MariadoSocorroCavalcanti.pdf	20/09/2018 09:46:15	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito
Outros	PatriciaMoura.pdf	20/09/2018 09:45:59	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito
Outros	TacianaBelmont.pdf	20/09/2018 09:45:07	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuenciahemope.pdf	25/07/2018 20:36:50	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencialCB.pdf	25/07/2018 20:36:32	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMODECONFIDENCIALIDADE.pdf	25/07/2018 20:36:19	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostro.pdf	25/07/2018 20:36:02	Kleyton Palmeira do Ó	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 26 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Magaly Bushatsky
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Arnóbio Marques, 310
Bairro: Santo Amaro **CEP:** 50.100-130
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)3184-1271 **Fax:** (81)3184-1271 **E-mail:** cep_huoc.procape@upe.br

ANEXO C - ATA DE DEFESA



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
 Instituto Aggeu Magalhães

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE Nº 76 DE DEFESA E ARGUIÇÃO DA TESE DE DOUTORADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE "DOUTOR EM CIÊNCIAS"

Aos dez dias do mês de maio de 2023, com início às 14:03 h e término às 17:20 h, realizou-se via Plataforma Digital Zoom Cloud Meeting a sessão pública para arguição e defesa da tese intitulada "AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS E EXPRESSÃO DOS GENES DAS METALOPROTEINASES(MMPs) E SEUS INIBIDORES (TIMPs) NOS EVENTOS VASO-OCCLUSIVOS EM JOVENS COM ANEMIA FALCIFORME", na área de concentração "Biologia celular e molecular básica e aplicada" e linha de pesquisa "Biotecnologia aplicada ao diagnóstico e controle de doenças infecciosas, parasitárias e crônicas", apresentada por **Kleyton Palmeira do Ó**, sob a orientação do Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos e coorientação da Dra. Taciana Furtado de Mendonça Belmont. A Comissão Examinadora indicada pela Coordenação de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde, conforme estabelece o Regimento Geral dos Cursos de Pós-Graduação da Fiocruz e o Regulamento específico da Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do IAM/Fiocruz, foi constituída pelos seguintes membros:

Dr. Walter Lins Barbosa Júnior – Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz
 1º Examinador

Dr. Matheus Filgueira Bezerra – Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz
 2º Examinador

Dr. Fábio Lopes de Melo – Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz
 3º Examinador

Dr. Christian Robson de Souza Reis – Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz
 4º Examinador

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos – Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz
 (Presidente da Comissão Examinadora e Orientador)

Atuaram como suplentes:

Dra. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura – UPE

PARECER:

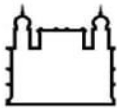
Após a apresentação do candidato, a Comissão Examinadora passou à arguição pública e o discente foi considerado

- Aprovado
 Reprovado
 Em exigência

E, para constar do processo respectivo, a Comissão Examinadora assina a presente ata, emitindo um parecer final.

A Comissão Examinadora é:

- Favorável à divulgação da tese em sua forma atual – **APROVADA**.
 Favorável à divulgação da tese após pequena revisão sugerida pela Comissão, até 30 dias – **APROVADA**.
 Desfavorável à divulgação da tese, devendo o(a) candidato(a) providenciar as alterações exigidas pela Comissão, até 90 dias - **EM EXIGÊNCIA**.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
 Instituto Aggeu Magalhães

O título do trabalho sofreu alterações? Sim Não. No caso de alteração, qual o novo título?

Observações da Banca: (recomendações de modificações, ajustes, sugestões de publicações, outros comentários; se necessário anexar folhas adicionais com parecer detalhado)

O discente foi arguido dentro do tempo destinado e respondeu de forma satisfatória aos questionamentos realizados, foram feitas sugestões no resumo para um maior detalhamento do mesmo, revisão bibliográfica com relação a fisiopatologia da doença além da metodologia com adequações no tempo verbal e detalhamento de aspectos técnicos, com relação a conclusão foram feitas sugestões para apresentação em tópicos.


 Assinado de forma digital por
 Walter Lins Barbosa
 Júnior:01544274467
 Dados: 2023.05.12 14:29:37
 -03'00'

(Assinatura Eletrônica)

 Dr. Walter Lins Barbosa Júnior – IAM/Fiocruz
 1º Examinador

 Assinado de forma digital por
 Matheus Figueira
 Bezerra:07125318401
 Dados: 2023.05.16
 15:42:04 -03'00'

(Assinatura Eletrônica)

 Dr. Matheus Figueira Bezerra – IAM/Fiocruz
 2º Examinador

 Assinado de forma digital por
 Fábio Lopes de Melo:53940822434
 Dados: 2023.05.16 12:45:56 -03'00'

(Assinatura Eletrônica)

 Dr. Fábio Lopes de Melo – IAM/Fiocruz
 3º Examinador

 Assinado de forma digital por
 Christian Robson de Souza
 Reis:02489893408
 Dados: 2023.05.18 11:30:13 -03'00'

(Assinatura Eletrônica)

 Dr. Christian Robson de Souza Reis – IAM/Fiocruz
 4º Examinador

 Assinado de forma digital por
 Luydson Richardson Silva
 Vasconcelos:01063888433
 Dados: 2023.05.10 17:33:48 -03'00'

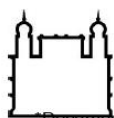
(Assinatura Eletrônica)

 Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos – IAM/Fiocruz
 (Presidente da Comissão Examinadora e Orientador)

Observação:

- 1- Registra-se que, por motivo de força maior, o Dr. Fábio Lopes de Melo assumiu a titularidade na Comissão Examinadora em substituição a Dra. Virgínia Maria Barros de Lorena – titular da banca.
- 2- A emissão do diploma e do histórico escolar está condicionada à entrega, na Secretaria Acadêmica, de três exemplares da dissertação (na íntegra), sendo um em capa dura, um em espiral e uma versão através de meio eletrônico enviado para Pgbbs.iam@fiocruz.br, após alterações sugeridas pela Comissão, contendo as assinaturas do orientador e de, pelo menos, um examinador na folha de aprovação de todos os exemplares.

Este documento não substitui o Diploma e o Histórico Escolar de conclusão do Curso.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Instituto Aggeu Magalhães

Documentos assinados pelo sistema ICP/Edu – consultar a veracidade da assinatura
em: <https://pessoal.icpedu.mp.br/public/verificar-assinatura>