



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LEONARDO PEIXOTO FERNANDES

**AVALIAÇÃO DO SNP RS12203592 COMO UM BIOMARCADOR DE GRAVIDADE
EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

FORTALEZA

2023

LEONARDO PEIXOTO FERNANDES

**AVALIAÇÃO DO SNP RS12203592 COMO UM BIOMARCADOR DE GRAVIDADE
EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito obrigatório à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F399a Fernandes, Leonardo Peixoto.
Avaliação do SNP rs12203592 como um biomarcador de gravidade em pacientes com anemia falciforme / Leonardo Peixoto Fernandes. – 2023.
100 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.
Coorientação: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio.
1. Biomarcadores. 2. Doença falciforme. 3. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. I. Título.
CDD 615
-

LEONARDO PEIXOTO FERNANDES

**AVALIAÇÃO DO SNP RS12203592 COMO UM BIOMARCADOR DE GRAVIDADE
EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito obrigatório à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Felipe Pantoja Mesquita
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Maria da Silva Pitombeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, minha orientadora, meu
coorientador e meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus pais, Leandro Batista Fernandes e Maria das Graças Peixoto Fernandes, por terem me dado força e apoio durante todos esses anos.

A meu querido irmão e irmã, Leandson Peixoto Fernandes e Leane Peixoto Fernandes, que tiveram um papel de extrema importância na minha formação tanto pessoal quanto profissional.

Aos meus queridos amigos, especialmente Thays Maria e Dayana Sousa, que me apoiaram e fizeram com que esses anos se tornem mais prazerosos.

À minha querida orientadora, Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, e a equipe do Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas e do Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica da UFC por todo carinho e conhecimento transmitido.

Ao meu querido coorientador, professor Dr. Tiago Lima Sampaio, por todo ensinamento e apoio.

Aos meus queridos professores, Prof. Dr. Felipe Pantoja Mesquita e Profa. Dra. Maria da Silva Pitombeira, por terem aceitado fazer parte da minha banca examinadora.

“São fúteis e cheias de erros as ciências que não
nasceram da experimentação, mãe de todo
conhecimento”

Leonardo da Vinci

RESUMO

Anemia falciforme (AF) tem como principais mecanismos a hemólise crônica e as crises recorrentes de vaso-oclusão (VOC). Ambas são responsáveis pelo processo inflamatório crônico e por danos endoteliais sistêmicos. A variabilidade clínica nesses pacientes é de causa multifatorial, sendo atribuído aos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP). O SNP no gene do fator regulador de interferon 4 (IRF4) tem sido associado com processo inflamatório em doenças oncohematológicas. Embora muitos estudos tenham associado IRF4 a diversas doenças, poucos têm relacionado esse fator de transcrição com AF. Nesse contexto, o estudo teve como objetivo avaliar a frequência de IRF4 na região rs12203592 e sua associação com biomarcadores clínicos e laboratoriais em pacientes com AF. Foram analisados 98 pacientes com AF (HbSS) em tratamento no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) e 79 do grupo controle (HbAA). Dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais foram coletados dos prontuários médicos, enquanto a dosagem sérica de interferon-gama (IFN- γ) e a identificação do SNP foram obtidas pelo Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (ELISA) e por Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (qPCR), respectivamente. Os dados foram expressos como média \pm EPM, sendo $*p < 0,05$. Notou-se que 55(56,2%) dos pacientes com AF residiam no interior do estado. O grupo C/C apresentou maior frequência 153(86,4%) na população estudada e não foi encontrada diferença na frequência dos alelos entre os pacientes com AF e controle. Pacientes com AF apresentaram um aumento de IFN- γ em comparação com o controle. Os grupos polimorfos (C/T e T/T) apresentaram maiores níveis de bilirrubina direta (BD), IFN- γ e de reticulócitos em comparação com o grupo C/C, bem como menores níveis de hemoglobina total e de hemoglobina fetal (HbF). O grupo T/T apresentou também maior atividade da alanina transferase (ALT), aspartato transferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e gamaglutamiltransferase (GGT). IFN- γ apresentou correlação positiva com ALT, AST, FA e GGT e correlação negativa com HbF. Além disso, HbF apresentou também correlação negativa com ALT e GGT em pacientes que não fazem uso de hidroxiureia. Ácido úrico e GGT são influenciados pelo genótipo, enquanto ureia, lactato desidrogenase e bilirrubina direta por hidroxiureia (HU). HbF e IFN- γ apresentaram área sobre a curva alto. O grupo polimorfo apresentou maior frequência de hepatomegalia, nefropatia falciforme e VOC e maiores chances de desenvolverem hepatite, síndrome torácica aguda (STA), necrose óssea e úlcera de membros. Conclui-se que o alelo T está envolvido com maior susceptibilidade a complicações na AF.

Palavras-chave: Biomarcadores. Doença falciforme. Polimorfismo de nucleotídeo único.

ABSTRACT

Sickle cell anemia's (SCA) main mechanisms are chronic hemolysis and recurrent vaso-occlusion (VOC) crises. Both are responsible for the chronic inflammatory process and systemic endothelial damage. The clinical variability in these patients has a multifactorial cause, being attributed to single nucleotide polymorphisms (SNP). The SNP in the interferon regulatory factor 4 (IRF4) gene has been associated with the inflammatory process in oncohematological diseases. Although many studies have associated IRF4 with various diseases, few have linked this transcription factor to sickle cell anemia. In this context, the study aimed to evaluate the frequency of IRF4 in the rs12203592 region and its association with clinical and laboratory biomarkers in patients with SCA. 98 patients with AF (HbSS) undergoing treatment at the Hematology and Hemotherapy Center of Ceará (HEMOCE) and 79 in the control group (HbAA) were analyzed. Sociodemographic, clinical and laboratory data were collected from medical records, while serum interferon-gamma (IFN- γ) dosage and SNP identification were obtained by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR), respectively. Data were expressed as mean \pm SEM, with * $p < 0.05$. It was observed that 55 (56.2%) of patients with AF lived in the interior of the state. The C/C group presented a higher frequency of 153 (86.4%) in the studied population and no difference was found in the frequency of alleles between patients with SCA and controls. AF patients showed an increase in IFN- γ compared to control. The polymorphic groups (C/T and T/T) had higher levels of direct bilirubin (BD), IFN- γ and reticulocytes compared to the C/C group, as well as lower levels of total hemoglobin and fetal hemoglobin (HbF). The T/T group also showed greater activity of alanine transferase (ALT), aspartate transferase (AST), alkaline phosphatase (FA) and gammaglutamyltransferase (GGT). IFN- γ showed a positive correlation with ALT, AST, FA and GGT and a negative correlation with HbF. Furthermore, HbF also showed a negative correlation with ALT and GGT in patients who do not use hydroxyurea. Uric acid and GGT are influenced by genotype, while urea, lactate dehydrogenase and direct bilirubin are influenced by hydroxyurea (HU). HbF and IFN- γ showed a high area under the curve. The polymorphic group had a higher frequency of hepatomegaly, sickle cell nephropathy and VOC and have a high chance of developing hepatitis, acute chest syndrome (AST), bone necrosis and limb ulcers. Therefore, the T allele is associated with greater susceptibility to

Keywords: Biomarkers. Sickle Cell disease. Single Nucleotide Polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquematização da mutação pontual no gene de HBB	18
Figura 2– Probabilidade dos portadores do traço falciforme transmitirem a hemoglobina S ..	19
Figura 3– Relação entre a frequência relativa do alelo HbS com endemicidade da malária....	20
Figura 4– Números estimados de nascimento com anemia falciforme por país.....	21
Figura 5 - Fisiopatologia da anemia falciforme	22
Figura 6 – Complicações clínicas associadas à anemia falciforme.....	24
Figura 7 - Alterações renais na anemia falciforme.....	29
Figura 8 - Esfregaço sanguíneo contendo drepanócitos.....	32
Figura 9 - Eletroforese de hemoglobina em gel de agarose alcalina.....	33
Figura 10 – Principais funções atribuídas ao interferon-gama	37
Figura 11 – Domínio de ligação do IRF.....	39
Figura 12 – Estrutura geral do IRF4.....	40
Figura 13 – Esquematização da expressão de BLIMP-1 por IRF4.....	41
Figura 14 – Polimorfismo de nucleotídeo único que acontece na anemia falciforme	42
Figura 15 – Localização do gene do fator regulador de interferon 4 no cromossomo 6.....	43
Figura 16 – Variáveis clínicas e laboratoriais dos pacientes com anemia falciforme	48
Figura 17 - Curvas características das reações dos fluoróforos VIC®(cor verde) e VAM®(cor azul).....	52
Figura 18 – Determinação do equilíbrio de Hardy-Weinberg para SNP rs12203592 na população estudada.....	57
Figura 19 – Comparação dos níveis séricos de interferon-gama entre pacientes e controle	58
Figura 20 – Comparação dos níveis séricos de interferon-gama de acordo com o genótipo nos pacientes com anemia falciforme.....	59
Figura 21 – Comparação dos níveis séricos de interferon-gama de acordo com os alelos nos pacientes com anemia falciforme.....	60
Figura 22 – parâmetros hematológicos de acordo com o genótipo.....	61
Figura 23 – Comparação dos parâmetros hematológicos de acordo com os alelos nos pacientes com anemia falciforme	62
Figura 24–Níveis de hemoglobina fetal de acordo com o genótipo nos pacientes que não fazem uso de hidroxiureia.....	63
Figura 25–Níveis de hemoglobina fetal de acordo com o alelo nos pacientes que não fazem uso de hidroxiureia	64

Figura 26- Correlação da hemoglobina fetal com os níveis séricos de interferon-gama nos pacientes que não fazem uso de hidroxiureia	65
Figura 27 - Comparação dos parâmetros bioquímicos de acordo com o genótipo nos pacientes com anemia falciforme	66
Figura 28 - Comparação dos parâmetros bioquímicos de acordo com os alelos nos pacientes com anemia falciforme	67
Figura 29 - Correlação entre interferon-gama e parâmetros bioquímicos nos pacientes com anemia falciforme.....	68
Figura 30 - Correlação de HbF com parâmetros bioquímicos nos pacientes que não usam HU	69
Figura 31 - Curvas de características de operação (ROC) para os níveis de hemoglobina fetal e de interferon-gama	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Ligação da sequência genética com a sonda marcada com o fluoróforo	51
Quadro 2 – Variáveis utilizadas em cada teste analítico.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Parâmetros sociodemográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com anemia falciforme.....	55
Tabela 2 - Frequência do polimorfismo rs12203592 na população estudada.....	56
Tabela 3 - Frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs12203592 nos pacientes com anemia falciforme e controle	57
Tabela 4- Tipos de hemoglobina de acordo com o genótipo nos pacientes com anemia falciforme	62
Tabela 5- Tipos de hemoglobina de acordo com os alelos nos pacientes com anemia falciforme	63
Tabela 6 - Parâmetros bioquímicos quanto ao uso de hidroxiureia e ao polimorfismo.....	70
Tabela 7- Frequência de complicação da anemia falciforme entre o grupo polimorfo e selvagem	72
Tabela 8 - Razão de chances dos pacientes sem polimorfismo e com maiores níveis de hemoglobina fetal desenvolverem complicações da anemia falciforme	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia Falciforme
ALT	Alanina Transferase
APC	Células apresentadoras de antígenos
AST	Aspartato Transferase
BLIMP-1	proteína 1 de maturação induzida por linfócito
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CN ⁻	Cianeto
CO	Monóxido de carbono
DF	Doença Falciforme
ERRO	Espécie Reativa de Oxigênio
ET-1	Endotelina 1
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GGT	Gamaglutamiltransferase
HbA	Hemoglobina A
HbA2	Hemoglobina A2
HbC	Hemoglobina C
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hematoterapia do Estado do Ceará
HU	Hidroxiureia
IL	Interleucina
INF-gama	Interferon gama
IRF	Fator regulador de Interferon
IRI	Lesão de Isquemia-Reperfusão
ISG	genes estimulados por interferon
LDH	Lactato Desidrogenase
LMC	Leucemia mieloide crônica
MM	Mieloma múltiplo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Redutase

NF- κ B	Fator nuclear
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Proteína C reativa
PHHF	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
PTCL	Linfoma periférico de células T
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i>
RNI	intermediários de nitrogênio reativo
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
STA	Síndrome Torácica Aguda
TGF- β	Fator de crescimento em transformação
TLR	Receptor Toll-like
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VCM	Volume Corpuscular Médio

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Alfa
B	Beta
δ	Delta
δ	Gama
®	Marca registrada
%	Porcentagem
<	Menor

SUMÁRIO

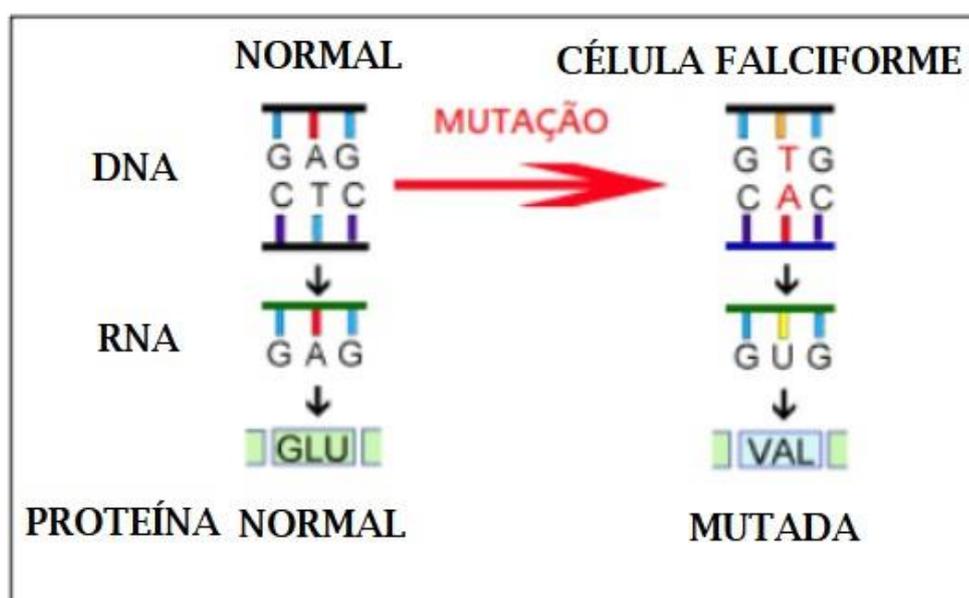
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 ANEMIA FALCIFORME	18
1.1.1 EPIDEMIOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME.....	19
1.1.2 FISIOPATOLOGIA	21
1.1.3 COMPLICAÇÕES CLÍNICA DA ANEMIA FALCIFORME	23
1.1.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ANEMIA FALCIFORME	32
1.1.5 TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME	34
1.1.5.1 HIDROXIUREIA.....	35
1.2 INTERFERON-GAMA E FATOR REGULADOR DE INTERFERON.....	36
1.2.1 INTERFERON-GAMA.....	36
1.2.2 FAMÍLIA DE FATORES REGULADORES DE INTERFERON (IRF)	38
1.2.3 FATOR REGULADOR DE INTERFERON 4 (IRF4)	39
1.3 POLIMORFISMO GENÉTICO	41
1.3.1 POLIMORFISMO NO GENE DO IRF4 RS12203592.....	43
2. OBJETIVOS	45
2.1 OBJETIVO GERAL	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 DESENHO DE ESTUDO.....	46
3.2 LOCAL DA PESQUISA	46
3.3 CASUÍSTICA.....	46
3.4 CRITÉRIO DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DO GRUPO COM ANEMIA FALCIFORME.....	47
3.5 CRITÉRIO DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DO GRUPO CONTROLE.....	47
3.6 COLETA DE DADOS E DE AMOSTRA	48
3.7 AVALIAÇÃO LABORATORIAL	49
3.7.1 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE INTERFERON-GAMA	49
3.8 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO DO FATOR REGULADOR DE INTERFERON 4 NA REGIÃO RS12203592	50
3.8.1 ISOLAMENTO DE DNA DO LEUCÓCITO.....	50
3.8.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR)	51
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
3.10 ASPECTOS ÉTICOS.....	54
4 RESULTADOS	55
5 DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	99
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	100

1. INTRODUÇÃO

1.1 Anemia Falciforme

A Anemia Falciforme é uma das doenças hereditárias mais frequente em todo mundo. É caracterizada como um distúrbio autossômico recessivo hereditário que tem como causa uma mutação pontual no cromossomo 11 no sexto códon, onde ocorre a troca da base nitrogenada adenina por timina, fazendo com que o aminoácido glutamato seja substituído por valina na cadeia da β -globina (figura 1). Essa mutação faz com que ocorra a síntese de uma hemoglobina anormal, denominada de hemoglobina S (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

Figura 1 – Esquemática da mutação pontual no gene de HBB



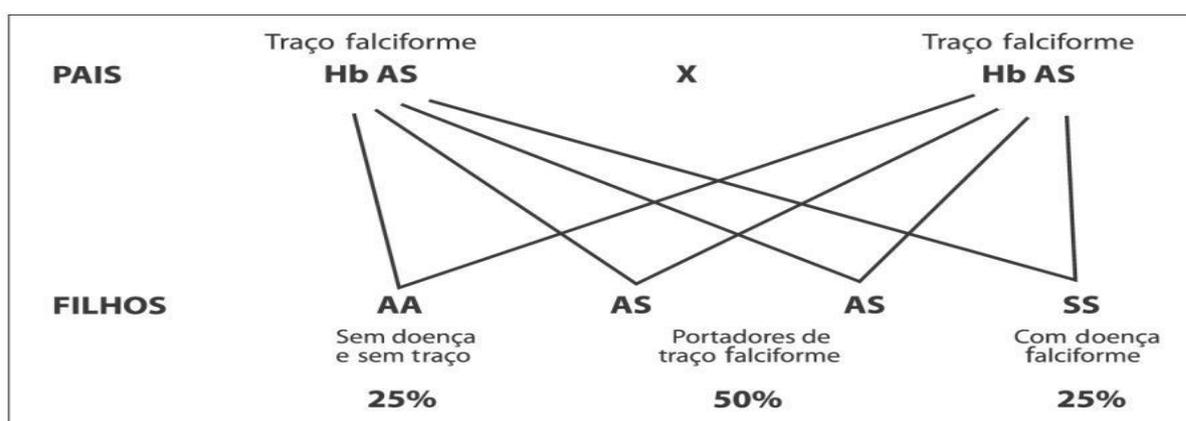
Fonte: adaptado UKEssays (2022).

Em 1910, Herrick relatou um caso de anemia em um estudante, em que os glóbulos vermelhos desse estudante eram peculiares, alongados e em forma de foice. Pauling, em 1949, descreveu anemia falciforme como uma doença molecular, tendo como causa a hemoglobina S (HbS). Já em 1957, Ingram descobriu que a HbS era causada por uma substituição pontual de um único aminoácido e, em 1963, Goldstein mostrou que essa substituição de aminoácido acontece devido a substituição de uma única base nitrogenada no códon 6 (STEINBERG, 1998).

Existem pessoas que apresentam o gene mutado de HBB (alelo β^S) combinado com o gene normal (alelo HBB), herdando um alelo do pai e outro da mãe. Nesses casos, essas pessoas possuem genótipo heterozigoto (HbAS), sendo identificados com traço falciforme. Acredita-se que 300 milhões de pessoas apresentam essa condição no mundo, sendo a maioria localizados em países africanos e tropicais onde a malária é endêmica (ASHOROBİ *et al.*, 2022).

Em adição, esses indivíduos são capazes de transmitir para seus descendentes os genes responsáveis pela AF (figura 2), sendo necessário a orientação adequada desses indivíduos sobre a possibilidade de gerarem crianças com AF. Com isso, o aconselhamento genético deve ser oferecido a esse público com a finalidade de educá-los sobre seu status e permitir que façam escolhas conscientes ao escolher um parceiro sexual (PECKER; NAIK, 2018).

Figura 2– Probabilidade dos portadores do traço falciforme transmitirem a hemoglobina S



Fonte: Ministério da saúde (2013). Legenda: um casal formado por indivíduos com genótipo heterozigoto (HbAS) apresentam a mesma probabilidade (25% de chances) de gerarem uma criança com/sem o traço falciforme e com/sem a doença. Ademais, esse mesmo casal tem 50% de chance de gerarem um filho com traço falciforme.

1.1.1 Epidemiologia da Anemia Falciforme

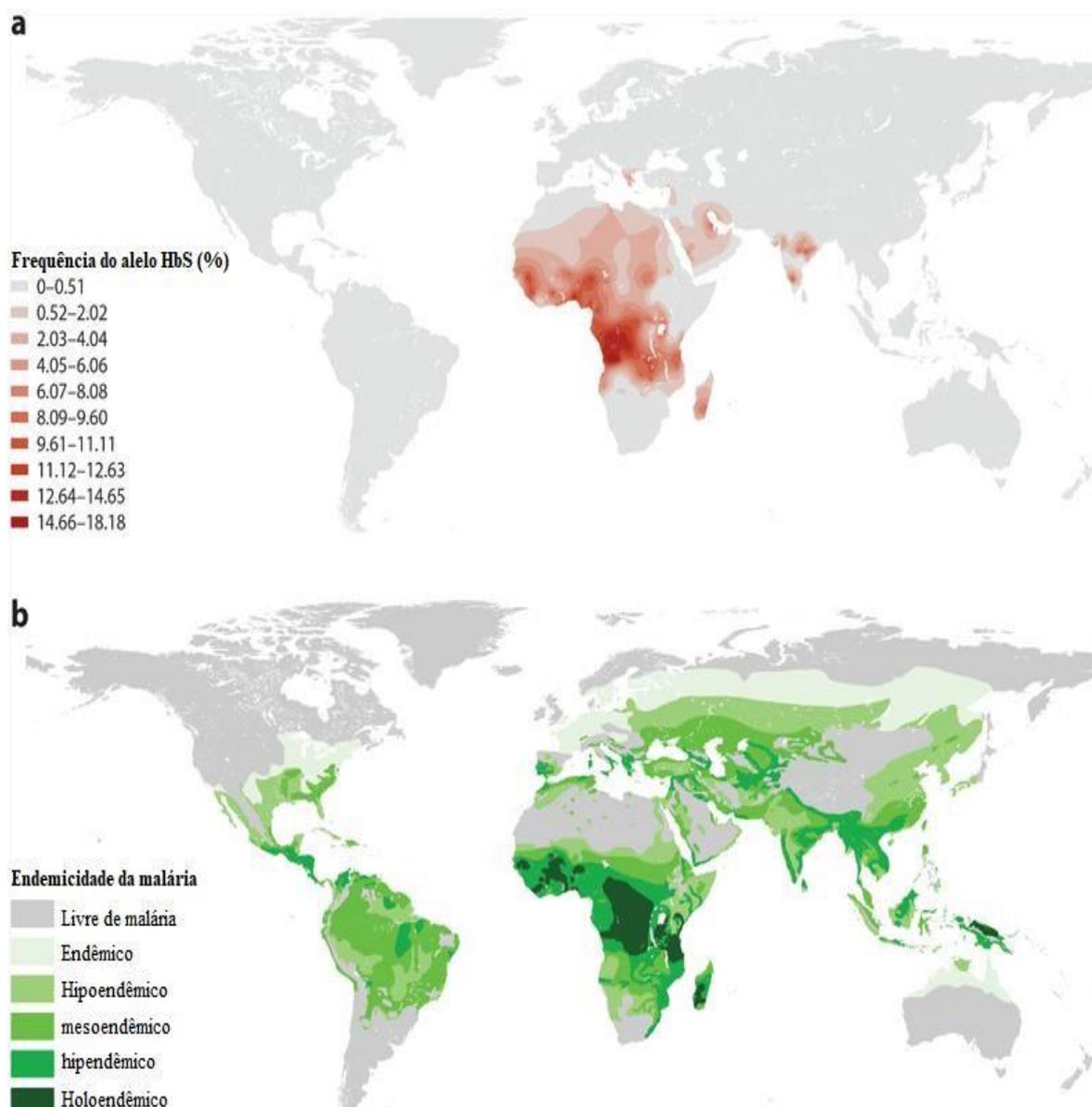
A distribuição geográfica da anemia falciforme está associada com a endemicidade da malária e dos movimentos migratórios (figura 3). A população da África subsaariana e parte do mediterrâneo, Oriente Médio e Índia, onde a malária é endêmica, apresenta uma maior taxa de nascimento, uma vez que a HbS fornece uma proteção evolutiva contra a malária grave em comparação com os indivíduos com hemoglobina A (DAAK *et al.*, 2016).

As células falciformes infectadas com o *plasmodium falciparum* inibem o crescimento parasitário por meio do baixo pH presente nessas células. Além disso, os drepanócitos são mais efetivamente removidas pelo baço. Ademais, o efeito protetor das células

falciformes contra à infecção da malária incluem alterações da expressão de moléculas de adesão presentes na superfície dessas células, as quais favorecem a interação e remoção destes por neutrófilos (CAO; VICKERS, 2021).

Os movimentos migratórios, como o tráfico de escravos africanos e as rotas comerciais de cana de açúcar e especiarias, promoveram uma distribuição do alelo β^S para as Américas, Europa e Ásia (KATO *et al.*, 2018). No Brasil, entre os séculos XVI e meados do XIX, acredita-se que mais de 4 milhões de africanos foram importados do continente africano para serem escravizados no país, tendo como origem principalmente países da costa ocidental da África onde a malária é endêmica (CAVALCANTI, 2019).

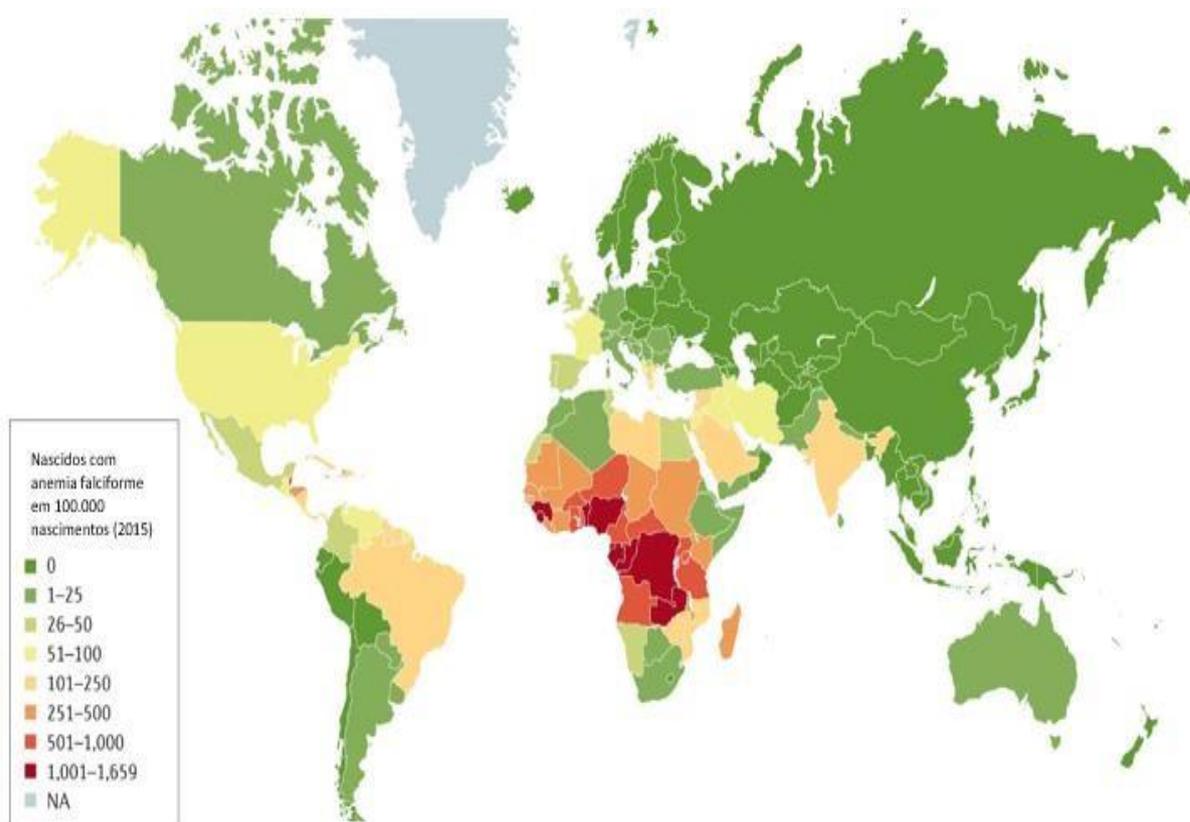
Figura 3– Relação entre a frequência relativa do alelo HbS com endemicidade da malária



Fonte: Piel *et al.*, (2010).

É estimado que nasçam 300.000 crianças por ano em todo mundo com DF, sendo a maioria desses nascimentos nos países tropicais e subtropicais (figura 4). No Brasil, acredita-se que cerca de 25 mil a 50 mil brasileiros tenham a doença falciforme, apresentando o genótipo homozigoto (HbSS), e que 4% da população do país possua o traço falciforme, possuindo o genótipo heterozigoto (HbAS). Essa doença é frequente em regiões que apresentam uma maior concentração de população negra e parda, sendo as regiões Norte e Nordeste do país com a maior prevalência da doença em decorrência da miscigenação e da maior concentração de afrodescendentes resultantes do tráfico de escravos (DUTRA; BIASSI; FIGUEIREDO, 2021).

Figura 4– Números estimados de nascimento com anemia falciforme por país



Fonte: adaptado de Kato *et al.*, (2018). Legenda: a figura mostra os números estimados de nascimento com anemia falciforme por 100.000 nascimento por país em 2015.

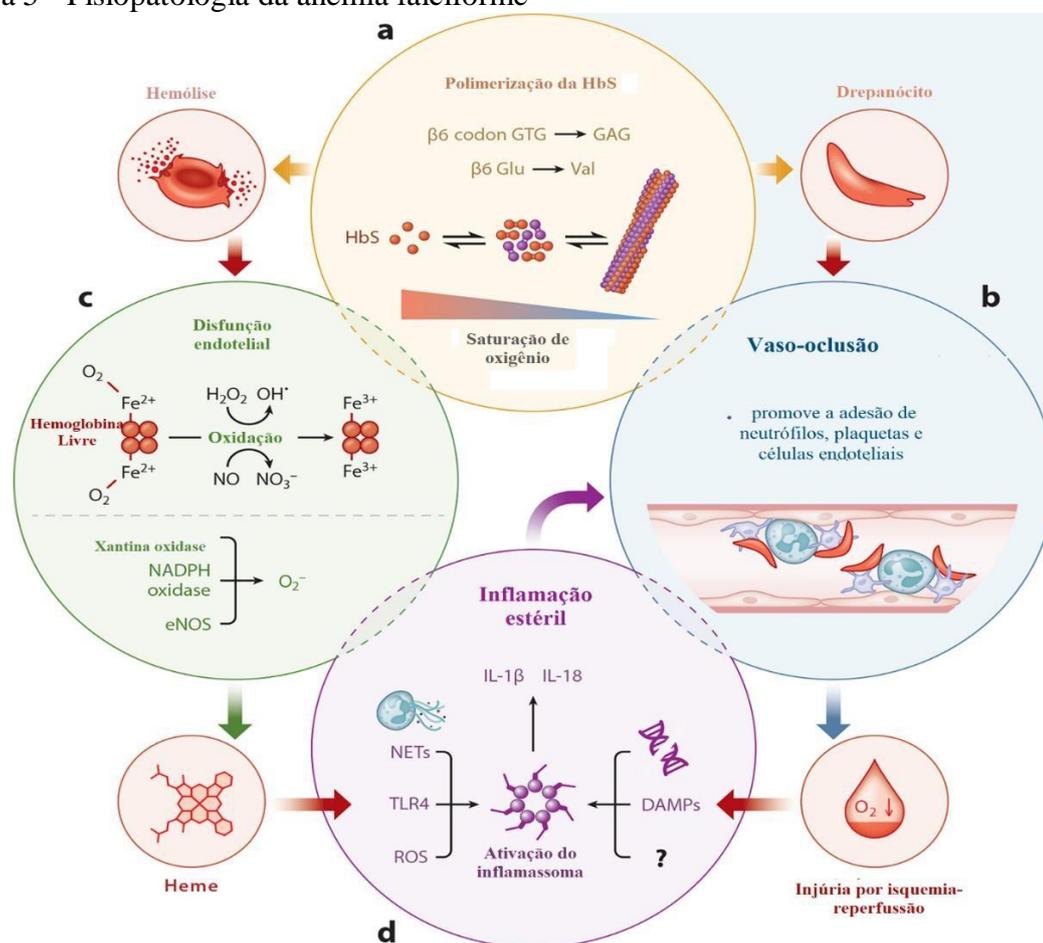
1.1.2 Fisiopatologia

Em condições de baixa concentração de oxigênio, pH ácido e aumento da temperatura, a HbS forma polímeros que modificam a forma física da hemácia, deixando-as em forma de “foice”. Essa alteração na membrana dos eritrócitos é reversível caso as células sejam reoxigenadas novamente, as quais retornam ao estado bicôncavo normal da hemácia. Entretanto,

após diversos ciclos de hipoxia/reoxigenação, as hemácias tornam-se permanentemente em forma de “foice” (HENRY *et al.*, 2020).

Atualmente, são conhecidas quatro vias patológicas dessa doença: a polimerização da HbS, a vaso-oclusão, a disfunção endotelial mediada por hemólise e a inflamação estéril (figura 5). Em regiões com pouca concentração de oxigênio, HbS sofre polimerização, formando estruturas filamentosas que se depositam nas hemácias que leva à alteração da forma física da célula, tornando-as semelhantes a uma “foice”, denominadas de drepanócitos (DALTRO *et al.*, 2020).

Figura 5 - Fisiopatologia da anemia falciforme



Fonte: adaptado Sundd, Gladwin e Novelli (2019).

A interação entre os drepanócitos e o endotélio vascular é responsável pelo processo de vaso-oclusão, sendo esse o principal mecanismo patogênico envolvido no curso natural da doença. Os eritrócitos contendo HbS apresentam uma maior expressão de moléculas de adesão em sua superfície (como glicolipídios sulfatados, fosfatidilserina (PS), CD36 e VLA-4), fazendo com que essas células apresentem uma maior interação com ligantes presentes no endotélio

vascular (como integrina $\alpha 5\beta 3$, moléculas CD36, fibronectina e VCAM-1) e com outros componentes da circulação, como leucócitos e plaquetas (STUART; SETTY, 1999).

A adesão dos drepanócitos com o endotélio vascular promove atraso do fluxo sanguíneo em decorrência do aumento do tempo de trânsito destas células pela vasculatura, permitindo a polimerização da HbS que contribui com a formação de novos drepanócitos. Essas células bloqueiam o fluxo sanguíneo, promovendo hipoxia seguida de vasodilatação que causam lesão de isquemia-reperfusão em órgãos-alvo (COOPER *et al.*, 2019).

Os drepanócitos apresentam tempo de meia-vida inferior em comparação com eritrócitos normais em seu formato de disco bicôncavo, sendo 21 dias e 180 dias respectivamente. Nesse sentido, essas células contendo HbS estão mais propensas a hemólise, que quando rompidas liberam hemoglobina livre na circulação. Essa junto com o grupo heme livre promovem disfunção endotelial, levando à produção de espécies reativas de oxigênio que causam danos endoteliais (TALL *et al.*, 2020).

Ademais, a hemólise intravascular promove também a depleção de óxido nítrico (NO) por meio da ação da enzima arginase, a qual também está presente no interior do eritrócito. Ela tem como função converter a L-arginina, principal substrato de NO, em ornitina. Assim, o NO, que é um importante vasodilatador, tem seus níveis reduzidos em decorrência da disponibilidade de seu principal substrato, favorecendo a vasoconstrição que resulta no surgimento de novos drepanócitos por meio da baixa concentração de oxigênio decorrente da redução do fluxo sanguíneo (CAO; VICKERS, 2021).

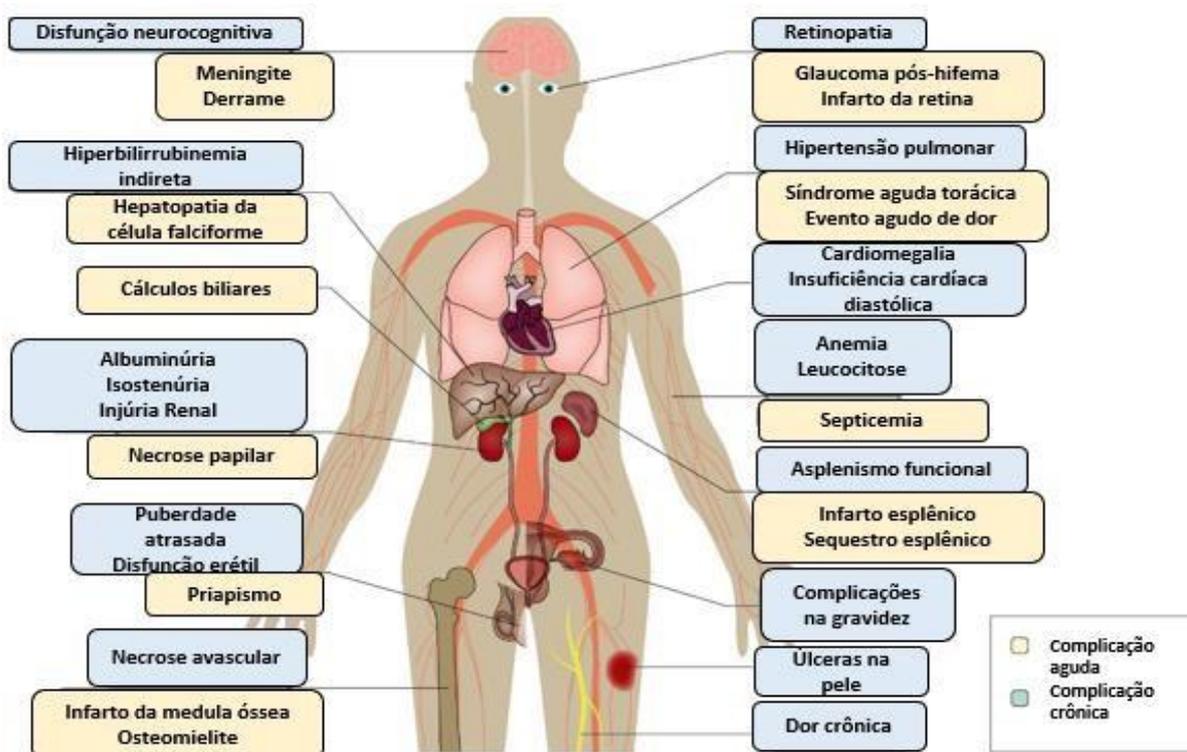
1.1.3 Complicações clínica da anemia falciforme

As sequelas clínicas da AF começam nos primeiros anos de vida e estende-se ao longo da vida do paciente, sendo bastante heterogêneas e abrange diversos órgãos e sistemas. Elas podem ser desde assintomáticos até formas incapacitantes ou com uma elevada taxa de mortalidade. Os fatores socioeconômicos do portador de AF, como acesso à assistência médica e renda, e genéticos, como concomitância com alfa-talassemia e níveis de hemoglobina fetal, interferem na gravidade dessa doença (MONFORT; SENET, 2020).

As complicações evidenciadas na AF são: episódios de dor induzida por vaso-occlusão, infecções recorrentes, exarcebações agudas da anemia [sequestro esplênico, crise aplástica (queda de $\pm 3\text{g/dL}$ nos níveis basais de hemoglobina e reticulocitopenia elevada)], complicações cardíacas (cardiomegalia, insuficiência cardíaca diastólica), complicações gastrointestinais e hepatobiliares (cálculos biliares, hepatopatia, sobrecarga de ferro,

hiperbilirrubinemia indireta), complicações musculares e esqueléticas (osteonecrose, úlceras de membros inferiores), complicações neurológicas (meningite, derrame, disfunções neurocognitivas), oftalmológicas (glaucoma, infarto de retina e retinopatia), pulmonares (síndrome torácica aguda), renais (injúria renal, necrose papilar), geniturinária (priapismo), esplênicas (figura 6) (OGU *et al.*, 2021).

Figura 6 – Complicações clínicas associadas à anemia falciforme



Fonte: adaptado de Kato *et al.*, (2018). Legenda: a figura mostra as complicações clínicas mais comuns observadas em paciente com anemia falciforme. Entre as complicações agudas, o evento agudo de dor é o mais comum, sendo necessário atendimento médico imediato. Por outro lado, as complicações crônicas podem se estender de dias a anos, afetando negativamente a qualidade de vida desse público.

As complicações agudas, como o evento agudo de dor e a síndrome torácica aguda, são eventos que necessitam de atendimento médico imediato. O acesso ao tratamento no início dos eventos agudos está associado com a redução da mortalidade e a morbidade desse público. Entretanto, pacientes com anemia falciforme que apresentam vulnerabilidade socioeconômica e baixa escolaridade são mais susceptíveis ao óbito e às sequelas crônicas (SOUZA, 2021).

As complicações crônicas podem se estender de dias a anos, afetando negativamente a qualidade de vida desses pacientes. As lesões crônicas estão associadas com danos em múltiplos órgãos promovidos pela vaso-oclusão. Essa condição resulta no aumento da demanda do sistema de saúde e dos profissionais de saúde, os quais já se encontram

sobrecarregados no Brasil (SAAD *et al.*, 1990).

Em adição, transtornos mentais, como depressão, ansiedade e suicídio, estão associados com essa condição, uma vez que tais complicações afetam a rotina e o humor desses indivíduos. As internações hospitalares recorrentes interferem na realização de tarefas diárias e profissionais, sendo essas pessoas mais susceptíveis a apresentar vulnerabilidade econômica (SOUZA, 2021).

1.1.3.1 Crises dolorosas

Os portadores de AF podem apresentar eventos dolorosos que duram de 4-6 dias a semanas, os quais se apresentam de início súbito, latejante e agudo. Geralmente, é a primeira manifestação clínica da AF e é o sintoma mais frequente, sendo responsáveis por 90% de todas as hospitalizações por AF. Podem estar presente nos primeiros anos de vida e se manter durante toda a vida. Episódios recorrentes têm um impacto negativo na qualidade de vida desses indivíduos, visto que eles alteram a rotina e o humor (ALSHAHRANI; ALGHAMDI, 2021).

As crises vaso-oclusivas são provenientes da oclusão microvascular, gerando dano tissular isquêmico secundário em decorrência da inflamação e da lesão por isquemia-reperusão. A redução no fluxo sanguíneo causa baixa concentração de oxigênio, acidose e alta osmolaridade, os quais favorecem a polimerização da HbS e a falcização de novos eritrócitos (COOPER *et al.*, 2019).

A intensidade e a frequência das crises vaso-oclusivas variam muito entre os pacientes. O pico de incidência ocorre no final da adolescência e início da vida adulta. As áreas mais frequentemente atingidas são as extremidades dos membros superiores e inferiores, peito, abdômen, articulações e costas. Nas crianças, a dactilite, que é caracterizado como edema de mãos e pés, é geralmente a primeira manifestação clínica observada, sendo sinal de alerta (DARBARI; SHEEHAN; BALLAS, 2020).

Com o avanço da idade, a dor leve e moderada torna-se mais comum. Pacientes pediátricos apresentam menor probabilidade de sofrerem com essa condição do que os adultos. O diagnóstico de crises vaso-oclusivas na DF pode ser confundido com outras complicações dessa doença, uma vez que muitos sofrem de dor crônica decorrentes da necrose avascular e da osteomielite (DAVIES, 1991).

O tratamento dessa condição consiste no manejo sintomático do episódio de dor. São utilizados anti-inflamatórios não-esteroides (AINES), como dipirona e paracetamol, no tratamento da dor leve e moderada e opioides, como a morfina e a metadona, na dor grave.

Além disso, são usadas abordagens não farmacológicas, como relaxamento, hipnose, calor, gelo e acupuntura (COOPER *et al.*, 2019).

Em relação aos aspectos socioeconômicos, a dor crônica está associada a uma maior vulnerabilidade econômica, visto que esses indivíduos necessitam se ausentar do emprego em decorrência de crises-vasooclusivas, interferindo negativamente na realização da atividade profissional. Ademais, por essa condição ser recorrentes, muitos apresentam quadros de ansiedade e depressão (SOUZA, 2021).

1.1.3.2 Manifestações gastrointestinais e hepatobiliares

Dentro do trato digestivo, o sistema hepatobiliar é o mais acometido nos pacientes com anemia falciforme (VATS *et al.*, 2020). As crises vaso-oclusivas na vasculatura do fígado, as múltiplas transfusões sanguíneas e a formação de cálculos biliares são as principais causas dessa condição. Acredita-se que entre 10 a 40% desses indivíduos apresentam disfunções hepatobiliares, sendo as complicações hepáticas responsáveis por cerca de 7% dos óbitos de pacientes portadores de anemia falciforme (CHAGAS; FRIGGI, 2022).

É importante que todos os pacientes com doença falciforme realizem exames de rastreio para doença hepática, incluindo exames laboratoriais, exames de imagem e, se necessário, biopsia hepática. Em relação aos exames laboratoriais, recomenda-se a dosagem das aminotransferases e de bilirrubina total e suas frações duas vezes ao ano (ALLALI *et al.*, 2021).

A hepatopatia falciforme é o termo denominado as alterações hepáticas que acometem os portadores de anemia falciforme, podendo ser aguda ou crônica. A crise hepática de células falciformes, o sequestro hepático e a colestase intra-hepática falciforme são as principais manifestações aguda de hepatopatia falciforme (SUDDLE, 2019); enquanto a doença do cálculo biliar (colelitíase e colangiopatia falciforme), a sobrecarga de ferro e as hepatites virais adquiridas são manifestações crônicas (GUTTERIDGE; NEWLAND; SEQUEIRA, 1985).

A crise hepática aguda de células falciformes é decorrente da obstrução sinusoidal por drepanócitos, resultando em lesão isquêmica hepática transitória. O paciente apresenta dor súbita no quadrante superior direito do abdômen, hepatomegalia dolorosa, icterícia e febre. Em relação aos achados laboratoriais, apresenta níveis elevados das aminotransferases (AST e ALT) e hiperbilirrubinemia que tendem a normalizar entre 3 a 14 dias. O tratamento consiste em hidratação e oxigenoterapia (PRAHARAJ; ANAND, 2021).

O sequestro hepático apresenta sintomas semelhantes da crise hepática. Clinicamente, os níveis das aminotransferases podem estar normais, entretanto apresenta hiperbilirrubinemia. Podem apresentar também queda do hematócrito e aumento de reticulócitos. É proveniente da retenção de quantidade significativa de eritrócito no fígado por meio da fagocitose desses pelas células de Kupffer, ocasionando na dilatação dos sinusóides. O tratamento consiste em suporte, normalizando entre 3 a 4 dias (SUDDLE, 2019).

A colestase intra-hepática é o acometimento hepático mais grave da doença falciforme. Pode evoluir para insuficiência hepática aguda, além de poderem desenvolver insuficiência renal, coagulopatia e encefalopatia. É resultado da vaso-oclusão decorrente da falcização dos eritrócitos nos sinusóides hepáticos, uma vez que esses são áreas que se encontra baixa concentração de oxigênio, favorecendo a formação de novos drepanócitos. Laboratorialmente, essa condição apresenta níveis elevados de aminotransferases e acentuada hiperbilirrubinemia, além de elevação do tempo de protrombina e da razão normalizada internacional (INR), acompanhados de diminuição do fibrinogênio (ALKHAYYAT *et al.*, 2020).

Entre 25 a 30% dos pacientes com doença falciforme apresentam lesões crônicas (HOGEN *et al.*, 2020). A colelitíase é o depósito de fluidos digestivos na vesícula biliar. É caracterizada pelo acúmulo de bilirrubina não conjugada resultante da hemólise crônica. Geralmente, os pacientes são assintomáticos. Nos sintomáticos, a dor abdominal é o sintoma mais comum, seguido de náuseas, vômitos e febre. As alterações laboratoriais podem expressar elevação discreta das aminotransferases e leucocitose. O tratamento consiste em uso de antibióticos e analgésicos, além do procedimento cirúrgicos nos casos mais graves (SAMUEL; JAIN *et al.*, 2022).

A sobrecarga de ferro é outro fator determinantes das lesões hepáticas crônicas, estando associado ao desenvolvimento de fibrose e cirrose hepática. As transfusões sanguíneas e a hemólise intravascular são responsáveis pelo aumento do estoque de ferro pelo fígado. O tratamento consiste com o uso de quelantes, como a deferoxamina (HOGEN *et al.*, 2020).

As hepatites virais promovem danos nos hepatócitos. Antes da aplicação dos métodos de triagem em doações de sangue, os pacientes com doença falciforme que necessitavam de múltiplas transfusões sanguíneas estavam sujeitos ao risco de adquirirem o vírus da hepatite B e C, bem como outros agentes etiológicos transmitidos pelo sangue (MEHRABANI *et al.*, 2019).

A coexistência da doença falciforme com hepatite viral pode agravar as lesões hepáticas, contribuindo com o aumento da mortalidade. Os pacientes falciformes com hepatites

virais, geralmente, são assintomáticos. Nos sintomáticos, são observados dor abdominal, hepatomegalia dolorosa, icterícia e mal-estar. Laboratorialmente, consiste em elevação acentuada das aminotransferases (MAWULI *et al.*, 2022).

1.1.3.3 Manifestações musculares, esqueléticas e dermatológicas

As úlceras de membros são as principais manifestações cutâneas observadas em pacientes com anemia falciforme. Geralmente, elas aparecem após a primeira década de vida, entre 10 a 50 anos, e é mais frequente em pacientes do gênero masculino. Podem surgir espontaneamente ou induzidas por pequenos traumas. Elas ocorrem principalmente em áreas com pouca gordura subcutânea, pele fina e baixo fluxo sanguíneo, como no terço inferior da perna. A patogênese inclui hipoxia tecidual decorrente da obstrução mecânica por hemácias falciformes, incompetência venosa e infecções bacterianas que levam à necrose (GRANJA *et al.*, 2020).

O processo de vaso-oclusão leva adesão dos drepanócitos com as células endoteliais, levando a redução do fluxo sanguíneo e favorecendo processos inflamatórios no lúmen do vaso. Além disso, a hemólise e o estresse oxidativo promovem dano endotelial, bem como a isquemia e a necrose. As úlceras de membros observadas nesses indivíduos são resistentes ao tratamento, podendo permanecer por meses a anos. Elas apresentam alta reincidência e são susceptíveis à infecção por diversos microrganismos (MONFORT; SENET, 2020).

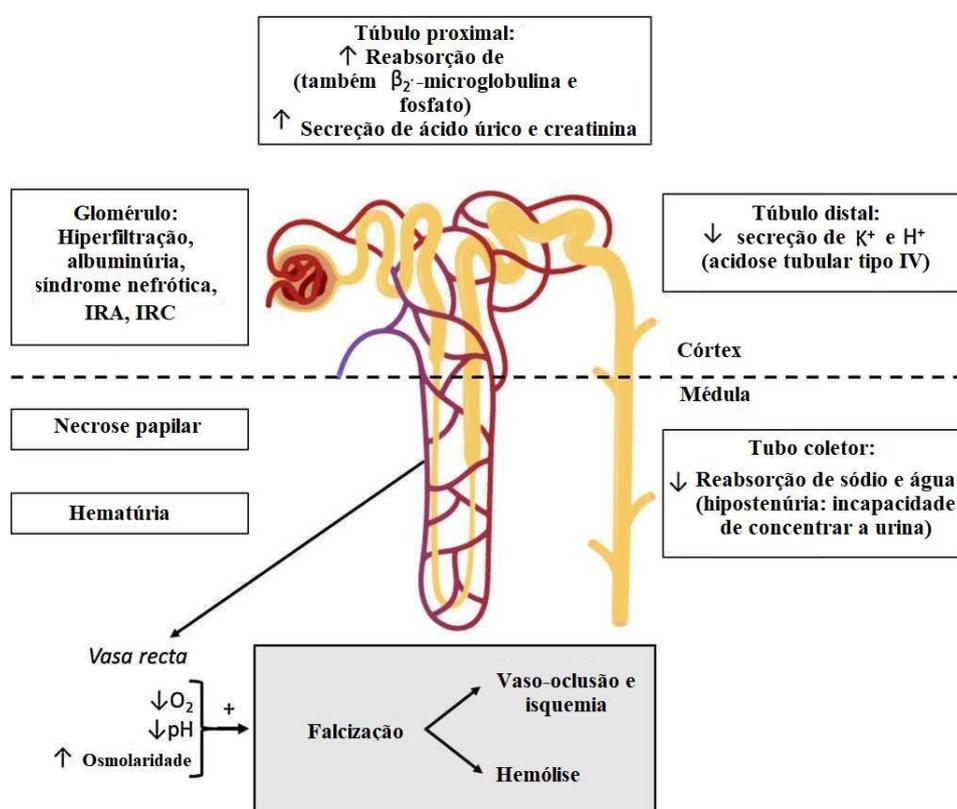
Por outro lado, a osteonecrose é uma complicação óssea grave que acomete os pacientes com AF a longo prazo. É caracterizada pela morte do tecido ósseo em decorrência da falta de suprimento sanguíneo proporcionados pela oclusão vascular. Nos estágios iniciais, ela é assintomática e, com o decorrer da doença, progride para deterioração óssea, colapso da articulação e artrite degenerativa. A região mais acometida é o quadril, seguido do joelho, ombro, tornozelo e coluna. Os indivíduos que apresentam essa condição sentem dor crônica, sendo motivo de visitas frequentes ao pronto-socorro, mobilidade prejudicada e diminuição da qualidade de vida (DALTRO *et al.*, 2020).

Em adição, processos inflamatórios estão envolvidos com o desenvolvimento e a progressão da osteonecrose. É evidenciado nesses pacientes níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IFN- γ . Além disso, ocorre o recrutamento de células do sistema imune para a região que está presente a lesão osteonecróticas, exacerbando ainda mais o processo inflamatório presente na região, como a produção de citocinas pró-inflamatórias (MILNER *et al.*, 1991).

1.1.3.4 Manifestações renais

As alterações renais estão entre as manifestações clínicas mais frequentes na anemia falciforme (figura 7). Podendo aparecer na primeira infância e se prolongar durante toda a vida do portador. Elas interferem negativamente na qualidade de vida desses indivíduos, sendo uma das principais causas de internações hospitalares e óbitos em adultos. O acompanhamento das funções renais nesse público é necessário para evitar a falência desse órgão (LIEM *et al.*, 2019).

Figura 7 - Alterações renais na anemia falciforme



Fonte: adaptado Payán-pernía *et al.*, (2021). Legenda: IRA: insuficiência renal aguda. IRC: insuficiência renal crônica.

O rim é susceptível a formação de novos drepanócitos, uma vez que a medula renal apresenta as condições ideais para a polimerização de HbS e, conseqüentemente, a falcização dos eritrócitos. A baixa pressão parcial de oxigênio (35-40mgHb), o pH ácido e a alta osmolaridade presentes na medula renal contribuem com a formação de novos drepanócitos, os quais promovem obstrução dos vasos renais que causam danos glomerulares e tubulares. Ademais, a isquemia medular induzida pela vaso-oclusão promove microinfarto e necrose papilar (ATAGA; ORRINGER, 2000).

Nefropatia falciforme é o termo denominado para se referir as alterações renais associada à anemia falciforme. A origem dessa doença é multifatorial, incluindo estresse oxidativo, lesão de isquemia-reperfusão, hemólise, hiperfiltração e hipertensão glomerular. Os pacientes podem apresentar enurese noturna, poliúria, albuminúria, hematúria, proteinúria e declínio progressivo da taxa de filtração glomerular. Dentre os exames laboratoriais, são dosados os níveis de albumina sérica, ureia, creatina (ATAGA; SARAF; DEREBAIL, 2022).

A hipostenúria, que se manifesta como enurese noturna e poliúria, aparece na primeira infância e é irreversível até os 15 anos de idade. A reabsorção de água e solutos nesses indivíduos são prejudicados, levando a redução da concentração parcial de oxigênio e do pH e aumento da osmolaridade. Isso favorece com a formação de novos drepanócitos e destruição dos vasos retos com o tempo em decorrência de vários ciclos repetidos de isquemia e infarto. Ademais, a hipostenúria aumenta o risco de desidratação e de crises vaso-oclusivas (LIEM *et al.*, 2019).

Acidose tubular renal distal é proveniente da redução da secreção de íons de hidrogênio e potássio. Dentre as causas, a obstrução do fluxo sanguíneo medular e a hipóxia secundária fazem com que a eliminação desses íons seja prejudicada, visto que o gradiente eletroquímico nos ductos coletores está reduzido (BELISÁRIO *et al.*, 2019).

A hematúria é comum em pacientes com anemia falciforme. Pode ser microscópica ou, na maioria dos casos, macroscópica e autolimitada. É decorrente de eventos vaso-oclusivos e microinfartos que afetam as papilas renais, causando necrose papilar. Clinicamente, os pacientes podem apresentar desde hematúria macroscópica assintomática até quadros agudos que incluem: dor, febre e, nos casos mais graves, insuficiência renal obstrutiva aguda. Ademais, a hemólise libera para o meio extracelular hemoglobina livre, causando danos oxidativos nas células tubulares renais. A hemoglobinúria é observada em 15 a 42% dos pacientes com anemia falciforme, sendo fator de risco de progressão da insuficiência renal crônica (AEDDULA *et al.*, 2022).

Os portados de anemia falciforme podem apresentar também aumento da taxa de filtração glomerular, sendo precedido, geralmente, de albuminúria. A liberação de vasodilatadores na medula renal, como as prostaglandinas, reduz a resistência vascular renal e aumentam o fluxo sanguíneo renal. A fração de filtração é diminuída em pacientes com anemia falciforme, promovendo perda dos néfrons justamedulares. Ademais, o aumento da taxa de filtração glomerular (TFG) está associado ao aumento da reabsorção de sódio, β 2-microglobulina e fosfato, além de induzir a secreção de ácido úrico e creatina. A reabsorção de sódio aumenta o consumo de oxigênio, promovendo a polimerização de HbS (BELISÁRIO *et al.*, 2019).

1.1.3.5 Manifestações pulmonares

Na síndrome torácica aguda (STA) é observado um novo infiltrado pulmonar visível na radiografia de tórax combinado com sintomas respiratórios, como febre, tosse, respiração rápida (taquipneia), dificuldade respiratória (dispneia) e baixa concentração de oxigênio no sangue (hipoxia). É a causa mais comum de morte em pacientes adultos com anemia falciforme e a segunda mais comum de hospitalizações após uma crise vaso-oclusiva (MARTÍ-CARVAJAL; CONTERNO; KNIGHT-MADDEN, 2019).

O mecanismo envolvido no desenvolvimento desta doença é multifatorial, sendo o mais comum o aumento da adesão dos drepanócitos na microvasculatura pulmonar na presença de hipóxia causado pelo processo de vaso-oclusão e entre outros fatores, como a presença de infecção, embolia gordurosa pulmonar e isquemia coronariana que culmina em infarto pulmonar (CHEMINET *et al.*, 2022).

Embora a infecção seja a principal causadora dessa condição em crianças e o infarto nos adultos, esses dois fatores estão inter-relacionados e podem ocorrer simultaneamente. Eventos recorrentes de STA podem causar fibrose pulmonar, hipertensão pulmonar e insuficiência cardíaca direita. A gravidade da doença varia de acordo com o estado geral de saúde do indivíduo, com a idade e com o genótipo. Nesse sentido, alguns indivíduos apresentam um risco maior, enquanto outros têm uma amenização do quadro de saúde (DOLATKHAH; DASTGIRI, 2020).

A liberação de marcadores inflamatórios e endoteliais e o aumento do estresse oxidativo desempenham papel fundamental no desenvolvimento dessa doença. A polimerização de HbS na vasculatura pulmonar resulta na obstrução dos vasos pulmonares, onde o processo inflamatório gerado pela interação dos drepanócitos com o endotélio pulmonar culmina em isquemia e, conseqüentemente, morte dos pneumócitos (YOUSEF *et al.*, 2022).

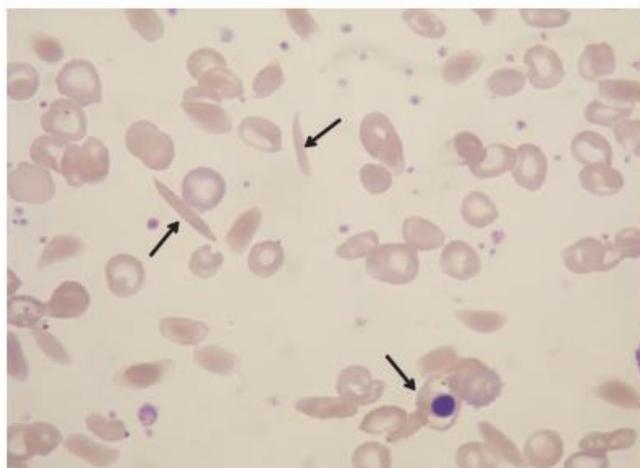
Intervenções precoces e agressivas são necessárias para evitar o óbito. O tratamento consiste em antibióticos de amplo espectro para tratar a causa infecciosa e uso de broncodilatadores, como o salbutamol e a terbutalina, para fornecer alívio rápido dos sintomas ao induzir a vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo. A oxigenoterapia é indicada para prevenir a hipoxia e, conseqüentemente, a polimerização da HbS na vasculatura pulmonar. Em casos graves, transfusões de concentrados de hemácias são necessários para normalizar os níveis basais de hemoglobina (SANTOLI *et al.*, 1998).

1.1.4 Diagnóstico laboratorial da anemia falciforme

Diferentes marcadores laboratoriais são utilizados no acompanhamento do paciente com AF, visto que eles orientam a equipe multidisciplinar à conduta terapêutica a ser tomada. A presença de alterações nesses indicadores podem ser indicativos de complicações graves da doença (XAVIER; ALBERTIM, 2021).

O processo de vaso-oclusão leva a produção de citocinas pró-inflamatória, como IL-6, IL-8, IFN- γ , em decorrência da injúria endotelial e do recrutamento de células imunes. As dosagens desses marcadores podem orientar a equipe médica sobre o perfil inflamatório em que o paciente se encontra (INUSA *et al.*, 2019). Na distensão sanguínea, encontram-se hemácias em forma de “foice” (figura 8) que estão associadas ao quadro hemolítico e ao processo de vaso-oclusão, em função da alteração da membrana das hemácias falciforme que apresenta aumento da fragilidade mecânica, perda da elasticidade e plasticidade (XAVIER; ALBERTIM, 2021).

Figura 8 - Esfregaço sanguíneo contendo drepanócitos



Fonte: Zago (2004). Legenda: presença de hemácias em forma de “foice” em paciente com anemia falciforme.

O exame de hemograma tem como função avaliar os glóbulos vermelhos, brancos e as plaquetas. Nele pode-se também avaliar indiretamente a medula óssea, ou seja, presença elevada de células jovens, como reticulócitos, é indicativo de hemólise exacerbada e desvio à esquerda decorrente da liberação de células jovens na circulação. É comum observar também no hemograma uma diminuição do conteúdo de hemoglobina, visto que a hemólise é característica dessa doença (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

As hemácias apresentam-se geralmente do tipo normocítico e normocrômica, podendo se tornar macrocítica com alto grau de anisocitose (RDW>15%) e poiquilocitose. A

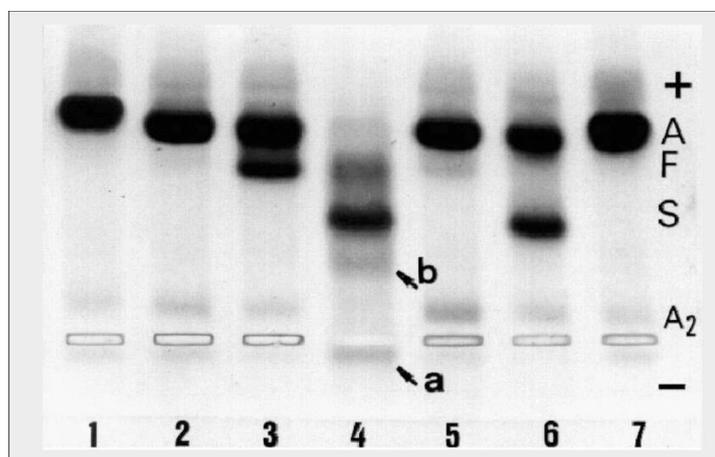
concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) pode-se encontrar normal. Os leucócitos estarão elevados devido às crises de hemólise ou infecção, bem como as plaquetas devido à relação de atrofia no baço (SANTIAGO *et al.*, 2020).

A presença de eritrócitos com alteração morfológica é proporcional a quantidade de hemoglobina S presente no meio e inversamente proporcional a concentração de oxigênio. Ademais, é evidenciado também a presença de reticulócitos no sangue desses pacientes, visto que a medula óssea tenta compensar a perda de hemácias devido a hemólise crônica com a liberação de células jovens na circulação (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

A lactato desidrogenase (LDH) é um marcador de hemólise intravascular que está presente nos glóbulos vermelhos, sendo sua elevação plasmática associado a manifestações clínicas da AF, como a hipertensão pulmonar, priapismo e úlceras de membros inferiores. Ademais, os marcadores hepáticos, como as enzimas Alanina Transferase (ALT) e Aspartato Transferase (AST), bem como os níveis de bilirrubina, principalmente a indireta, estão elevados em lesões hepáticas decorrentes da oclusão vascular (SANTIAGO *et al.*, 2020).

Existem diversos métodos utilizados para o diagnóstico de anemia falciforme. Dentre os mais comuns, destacam-se a eletroforese em pH alcalino em acetato de celulose e a análise de morfologia eritrocitária por meio da técnica de distensão sanguínea. A eletroforese da hemoglobina identifica as variantes de hemoglobina por meio da diferença de carga negativa e peso molecular (figura 9). Nessa técnica, nota-se que a HbS migra mais lentamente que a HbA, visto que a substituição de um aminoácido negativamente carregado (ácido glutâmico) por um neutro (valina), faz com que ocorra uma diferença na velocidade de migração (NAOUM; SOUZA, 2004).

Figura 9 - Eletroforese de hemoglobina em gel de agarose alcalina



Fonte: Naoum e souza (2004).

A triagem neonatal para HbS é de fundamental importância para o diagnóstico da anemia falciforme, visto que a identificação precoce da doença pode prevenir complicações e óbitos na primeira infância. Desde 2001, o “Teste do Pezinho” é gratuito e obrigatório a todos os recém-nascido no Brasil. Ele tem como finalidade investigar, entre outras doenças, a presença de hemoglobinopatias, identificando precocemente variações de hemoglobina que causam doenças, como HbS e HbC. É realizado por meio da técnica de eletroforese de hemoglobina e, preferencialmente, por HPLC (BRANDOW; LIEM, 2022).

Outra ferramenta utilizada na identificação de anemia falciforme na população em geral é a triagem de doadores de sangue. Desde 1976, é realizado o teste de reconhecimento da hemoglobina S. Homens e mulheres com traço falciforme, apesar de serem saudáveis, são identificados e orientados sobre o potencial de gerarem crianças com doença falciforme (WILSON; ELLSWORTH; KEY, 2020).

1.1.5 Tratamento da Anemia Falciforme

Os medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da AF são a hidroxureia (HU) e a L-glutamina. A HU foi o único fármaco aprovado pela FDA por quase 2 décadas, sendo em 2017 a L-glutamina aprovada para a prevenção das complicações agudas da AF. Ambos os fármacos atuam na prevenção das manifestações clínicas, atuando na redução da mortalidade e morbidade dessa doença (VINHAES *et al.*, 2020).

A HU é a principal moduladora do curso da doença. Ela atua elevando a concentração sérica de HbF, inibindo a polimerização de HbS e, conseqüentemente, evita a formação de novos drepanócitos. Por outro lado, a L-glutamina eleva a proporção da forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) em eritrócitos falciformes, reduzindo o estresse oxidativo. Esse fármaco tem a capacidade de se converter em glutamato no interior das células, atuando como um precursor da formação da glutatona que tem ação benéfica nos eritrócitos ao apresentar propriedades antioxidantes (ALLARD *et al.*, 2021).

Além desses medicamentos, são utilizadas estratégias terapêuticas complementares, como o uso de anti-inflamatórios e antiplaquetários para tratar as crises vaso-oclusivas. São administrados antibióticos para tratar infecções recorrentes e, nos casos com níveis basais alarmantes de hemoglobina, são recomendadas transfusões de concentrado de hemácias para elevar os níveis de hemoglobina A (CISNEROS; THEIN, 2020).

Todavia, apesar dessas ferramentas farmacológicas serem eficazes na prevenção de complicações graves de AF, a expectativa de vida das pessoas que convivem com DF nos Estados Unidos é de 45-58 anos, em comparação com a população em geral que é de 78 anos (LUBECK *et al.*, 2019).

1.1.5.1 Hidroxiureia

Desde 1998, a hidroxiureia (HU), um inibidor da fase S do ciclo celular, é a principal terapia medicamentosa usada no tratamento da AF. O mecanismo de ação desse fármaco ainda não é totalmente compreendido. Os efeitos benéficos da HU na AF são atribuídos principalmente a sua capacidade de elevar os níveis séricos de HbF e dos seus efeitos anti-inflamatórios, como propiciar a redução dos números de reticulócitos e leucócitos circulantes, inibição da expressão de molécula de adesão e indução da produção de NO (YAHOUÉDÉHOU *et al.*, 2019).

Os pacientes que fazem tratamento com HU apresentam também aumento do volume da hemácia, redução da deformidade da membrana plasmática e diminuição da viscosidade plasmática, permitindo um fluxo contínuo de sangue pelos capilares. Ademais, a HU aumenta a concentração de hemoglobina total, diminuindo a necessidade de transfusões de concentrado de hemácia. Dessa maneira, o tratamento com HU leva à redução das células falciformes, prevenindo as manifestações clínicas da AF (MANGLA *et al.*, 2022).

De acordo com o Ministério da Saúde (2013), os pacientes que fazem uso de HU deve preencher todos os critérios a seguir: 1) eletroforese de hemoglobina compatível com o diagnóstico de AF (HbSS); 2) idade igual ou maior que 2 anos; 3) possibilidade de comparecer as revisões periódicas; 4) beta HCG sérico negativo para mulheres em idade reprodutivo; e apresentar complicações clínicas.

A HU está disponível em cápsulas em gel sólido contendo 500mg do princípio ativo. Apresenta um excelente biodisponibilidade em sua forma oral e é rapidamente eliminada na circulação com meia-vida de 2 a 3 horas na maioria dos adultos e crianças, sendo um medicamento bem tolerado e com baixa toxicidade a curto ou longo prazo. A toxicidade de curto prazo mais comum é a citopenia leve, a qual é reversível (TISDALE; THEIN; EATON, 2020).

Apesar desse fármaco ser um agente quimioterápico bastante utilizado, o risco-benefício na AF é aceitável. A probabilidade de HU causar efeitos indesejáveis é menor do que os desfechos fatais gerados pelo curso natural da doença. A HU pode causar efeitos

neurológicos (letargia, cefaleia, tonturas), gastrointestinais (náuseas, vômitos, diarreia), dermatológicos (alopecia, erupção maculopapular, eritema facial e periférico), renais e hepáticos (elevação dos níveis séricos de ureia, creatinina e das aminotransferases), reprodutivo (efeito teratogênico fetal), hematológicos (mielotoxicidade), entre outros. Nesse sentido, é necessário monitoramento frequente dos efeitos citotóxicos do fármaco, bem como da avaliação da função renal e hepática (Ministério da saúde, 2010).

1.2 Interferon-gama e fator regulador de interferon

1.2.1 Interferon-gama

Os interferons (INF) são um conjunto de citocinas que estão envolvidas na defesa do organismo contra patógenos, estando envolvidos nas respostas imunes. São divididos em dois tipos, sendo eles: tipo I (INF- α e β) e tipo II (IFN- γ). Os interferons alfa e beta são produzidos por diversas células em resposta à infecção viral, enquanto IFN- γ é produzido por células do sistema imune após o reconhecimento do antígeno por células apresentadoras de antígenos (APC). Eles têm como função efeito antiviral, regulação do crescimento celular e modulação da resposta imune, além da capacidade de diminuir a expressão de oncogênese e receptores de fatores de crescimento (JORGOVANOVIC *et al.*, 2020).

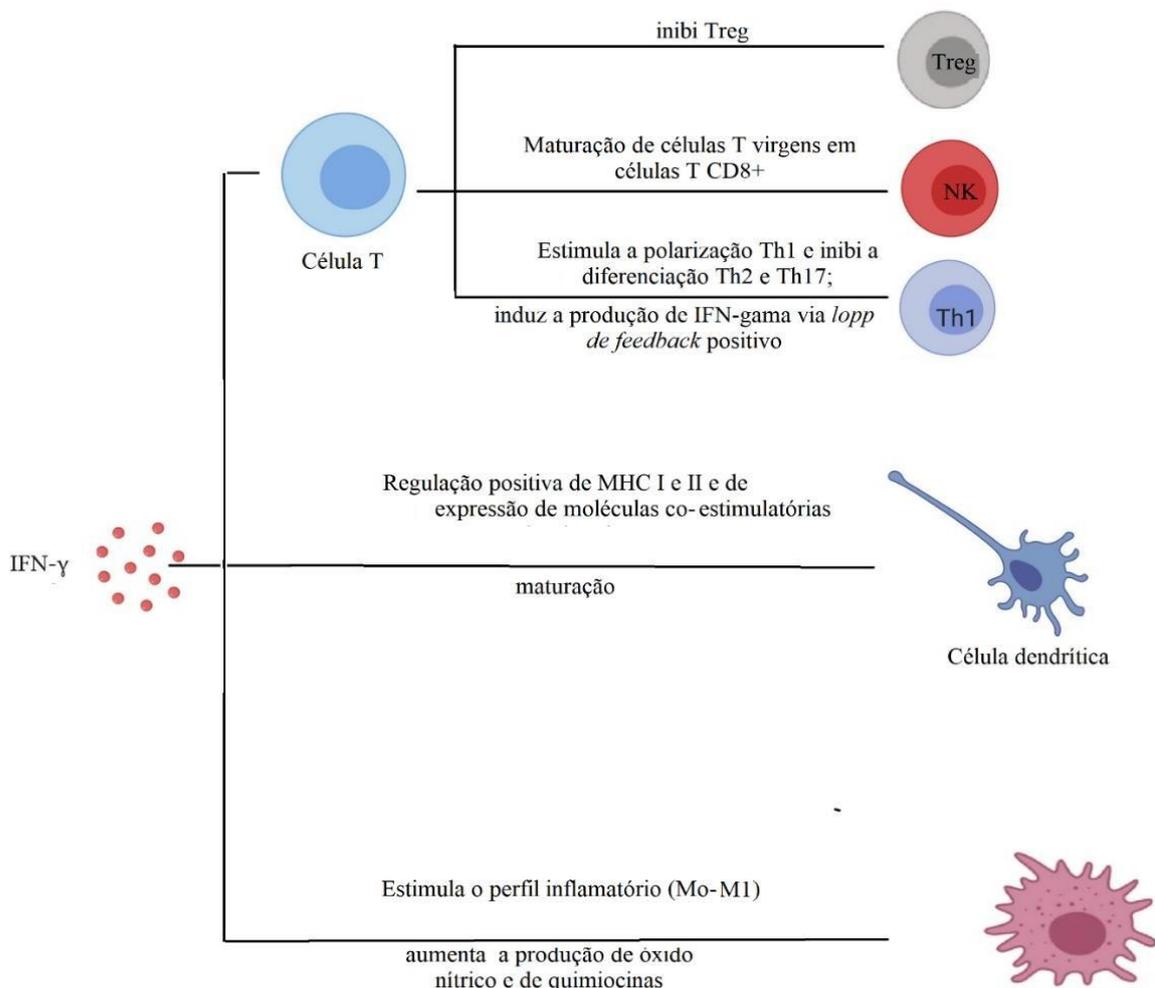
O IFN- γ é o único tipo da classe de interferons que pode induzir respostas imunes inata e adaptativa contra vírus, bactérias e tumores. Nesse sentido, essa citocina apresenta um papel importante no reconhecimento e eliminação de microrganismos, coordenando uma infinidade de funções no combate à infecção. Dessa maneira, o IFN- γ é umas das principais citocinas envolvidas com a inflamação, promovendo reações inflamatórias ricas em macrófagos e pobres em eosinófilos dependentes de IgE (CORDEIRO *et al.*, 2022).

O IFN- γ é produzido principalmente por células T CD4⁺ e CD8⁺ nas respostas imunes adaptativas, enquanto na imunidade inata pelas células *Natural Killer* (NK). Essas células são estimuladas por interleucinas (IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21), patógenos e por IFN- γ num *loop* de *feedback* positivo que levam à liberação de mais IFN- γ . Adicionalmente, essa citocina também pode estimular a APC a liberar IL-12 (JORGOVANOVIC *et al.*, 2020).

Dentre as funções do IFN- γ , estão incluídos: o aumento da expressão dos antígenos do complexo maior de histocompatibilidade I e II, favorecendo o reconhecimento dos antígenos pelas células T por meio da interação dessas com as células apresentadoras de antígenos; a ativação das células NK que faz com que elas liberem granzimas e perforinas, promovendo

morte celular. Em monócito e macrófagos, IFN- γ estimula a síntese de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e NO (figura 10) (CORDEIRO *et al.*, 2022).

Figura 10 – Principais funções atribuídas ao interferon-gama



Fonte: adaptado Jorgovanovic *et al.*, 2020. Legenda: IFN- γ interage com células do sistema imunes, como células T, macrófagos e células dendríticas em um microambiente inflamado. Nas *células T*, o IFN- γ inibe células T reguladoras, estimular a diferenciação de célula T virgens para o subconjunto Th1. Por meio de um loop de feedback positivo, o IFN- γ estimula sua própria produção nas células Th1 e inibe a diferenciação de Th2 e Th17. O IFN- γ é necessário para a maturação de células T virgens em células T CD8+ efetoras. Já nas *células dendríticas*, essa glicoproteína age na maturação dessas células e na regulação positiva de MHC I e II. Por outro lado, nos *macrófagos*, o IFN- γ estimula a polarização dos macrófagos em direção ao fenótipo pró-inflamatório M1 e aumenta sua capacidade de secreção de quimiocinas, as quais atuam recrutando macrófagos e células T para o local inflamado.

Além disso, essa glicoproteína atua também na diferenciação do linfócito T em Th1, sendo essa célula responsável pela síntese de moléculas pró-inflamatórias (IL-2, IL-12, IL-6, IL-8 e IFN- γ) envolvidas nas respostas imunes. Assim, o IFN- γ é uma molécula efetora robusta que medeia a proteção contra uma ampla gama de entidades patogênicas, além de ter ação imunomoduladora (GAO *et al.*, 2021).

A produção excessiva do IFN- γ contribui para o agravamento de certas doenças, como no Lúpus eritematoso sistêmico (THOMASON *et al.*, 2020). Estudos indicam que o IFN- γ tem sua concentração plasmática aumentada em pacientes com anemia falciforme, podendo modular a função de macrófagos e o número de células T auxiliares, bem como outros tipos celulares pró-inflamatórios (JORGOVANOVIC *et al.*, 2020).

Na anemia falciforme, é observado um aumento das citocinas pró-inflamatórias em comparação com as anti-inflamatórias. A principal glicoproteína que apresenta elevação dos seus níveis séricos nessa condição é o IFN- γ . Com isso, acredita-se que o IFN- γ favoreça a manutenção da inflamação generalizada que é característica dessa doença, uma vez que o processo de vaso-oclusão, principal mecanismo patogênico envolvido com a gravidade dessa doença, é favorecido em ambientes pró-inflamatórios (WANG *et al.*, 2022).

Além disso, o IFN- γ inibe o crescimento de células progenitoras da medula óssea que dão origem aos eritrócitos maduros, além de reduzir a síntese da cadeia gama de globina que compõe HbF (CORDEIRO *et al.*, 2022). Isso contribui para uma evolução clínica desfavorável, uma vez que níveis reduzidos de HbF em paciente com anemia falciforme estão associados a quadro clínico mais grave (HASHEMI; EBRAHIMZAADEH, 2022).

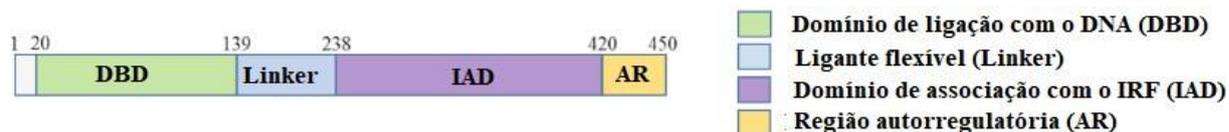
1.2.2 Família de Fatores Reguladores de Interferon (IRF)

Os Fatores Reguladores de Interferon (IRF – *Interferon Regulatory Factor*) são uma família de fatores de transcrição que têm como função regular a transcrição de interferons e a expressão de genes induzidos por IFN. São proteínas imunomoduladores vitais do sistema imune inato e adaptativo, apresentando uma multiplicidade de funções. Os IRF atuam nas vias de sinalização do receptor Toll-like (TLR) e IFN, além de participarem da maturação e diferenciação de células hematopoiéticas [células mielóides, linfóides (B, T e NK) e células dendríticas], regulação do ciclo celular, apoptose e oncogênese. São divididos em nove membros, sendo eles: IRF-1, IRF-2, IRF-3, IRF-4, IRF-5, IRF-6, IRF-7, IRF-8 e IRF-9 (JEFFERIES *et al.*, 2019).

Os IRF são ativados diretamente por meio dos estímulos de antígenos, sendo o IFN um importante regulador dos genes do IRF. Os genes regulados por IRF têm sequência de reconhecimento 5'-GAAA-3', a qual IRF têm a capacidade de se ligarem ao DNA, modulando as respostas celulares. Eles possuem dois domínios de ligação: um domínio de ligação ao DNA altamente conservado (DBD), composto por cinco repetições de triptofano na região N-terminal que facilita a ligação ao DNA, e domínio associado ao IRF (IAD) na região C-terminal, que é

um domínio de interação proteína-proteína que medeia a interação entre os IRF e outros fatores de transcrição. Além disso, IAD contém uma região autorregulatória que se liga diretamente ao DBD e inibe sua ligação ao DNA (figura 11) (SUNDARARAJ *et al.*, 2021).

Figura 11 – Domínio de ligação do IRF



Fonte: adaptado Sundararaj *et al.*, (2021). Legenda: a figura representa os dois principais domínios estruturais presentes na molécula dos IRF: o domínio de ligação com o DNA (DBD) e o domínio de associação ao IRF (IAD). Além disso, nota-se a região autorregulatória que está presente no IAD, inibindo a ligação de DBD ao DNA.

Quando padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e IFN interagem com TLR e receptores de IFN respectivamente, iniciam-se uma cascata de sinalização que leva à ativação de IRF e sua realocização para o núcleo onde eles ativam a expressão gênica. Com isso, eles apresentam a capacidade de interagir com outros parceiros transcricionais, como STATs e NF- κ B, permitindo que os IRF ativem um amplo espectro de genes e controlem diversas vias de transcrições vitais para o sistema imunológico (ANTONCZYK *et al.*, 2019).

1.2.3 Fator Regulador de Interferon 4 (IRF4)

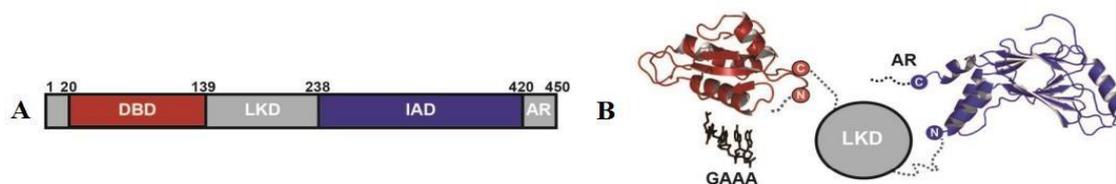
O fator regulador do interferon 4 (IRF4), também conhecido como mieloma múltiplo 1 (MUM1) e fator regulador de interferon específico de linfócito (LSIRF), é um fator de transcrição que está presente exclusivamente em células do sistema imune. É o único IRF que não é regulado por interferons, sendo ativado pelo receptor TLR, receptor de membrana CD40 e pelo receptor de Fator de Necrose Tumoral (TNF) e IL-4 (SUNDARARAJ *et al.*, 2021).

Dentre suas funções, IRF4 atua na maturação e na diferenciação de células B e T, regula a expressão gênica de diversos genes induzida por IFN relevantes para uma resposta imune funcional, além de regular o ciclo celular, apoptose e oncogênese; participando tanto da imunidade inata quanto adaptativa. IRF4 reprime os principais genes envolvidos no ponto de checagem mitótico, reparo do DNA e vias apoptóticas (COOK *et al.*, 2020).

O IRF4 apresenta dois domínios estruturais ligados por um ligante flexível (LKD): um domínio N-terminal de ligação ao DNA (DBD), composto por cinco resíduos de triptofano conservados que lhe permite formar uma conformação hélice-alça-hélice que facilita a ligação com o DNA alvo, e um domínio variável C-terminal associado a IRF(IAD), que tem como

função permitir a interação proteína-proteína com outros fatores de transcrição. O domínio IAD contém uma região inibitória (AR) que se liga diretamente a DBD e regula sua interação com o DNA alvo (figura 12) (AGNARELLI; CHEVASSUT; MANCINI, 2018).

Figura 12 – Estrutura geral do IRF4



Fonte: adaptado de Agnarelli; Chevassut e Mancini (2018). Legenda: A figura esquematiza a estrutura geral de IRF4. A figura 12A mostra os domínios de ligação do IRF4: domínio de ligação de DNA (DBD), domínio de ligação (LKD), ativação de interferon (IAD) e região auto-inibitória (AR). Na figura 12B, observa-se a estrutura cristalina do IRF4 ligada ao promotor com sequência de reconhecimento 5'-GAAA-3'.

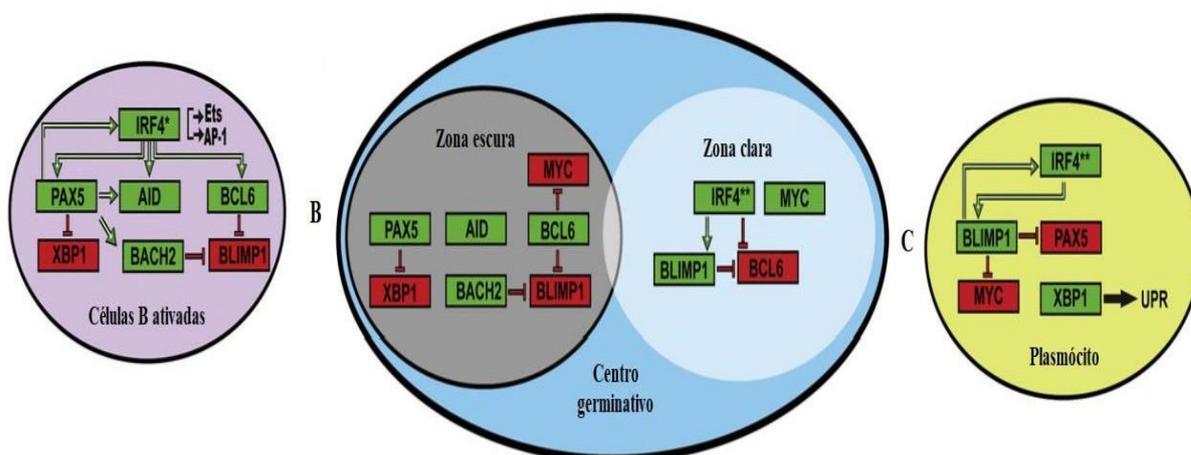
Embora não dependa da indução por interferon, eles atuam regulando a ativação de genes estimulados por interferon (ISG) ao se ligarem aos elementos de resposta estimulados por interferon (ISRE), que possuem sequência de reconhecimento 5'-GAAA-3'. Portanto, o fator regulador de interferon 4 atua ativando a expressão de outros genes durante o desenvolvimento e diferenciação celular, possuindo papel crucial nas respostas imunes (SUNDARARAJ *et al.*, 2021).

Nas células T, IRF4 apresenta papel central na diferenciação e expansão de células T CD4⁺ e CD8⁺. Estudos de Lee *et al.*, (2020) em camundongos demonstrou que IRF4 inibe resposta imunes Th2 e favorece subconjuntos de células T que promovem uma inflamação tecidual mais exacerbada. Além disso, eles concluíram que a depleção de IRF4 está envolvida com respostas imunes prejudicadas, favorecendo infecções oportunistas. Ademais, Grusdat *et al.*, (2014) identificaram que a deleção de IRF4 apresentaram redução da função efetora de T CD8⁺ em camundongos infectados com o vírus da coriomeningite linfocítica, indicando falha no combate ao patógeno.

As células B apresentam papel fundamental na resposta imune humoral. O IRF4 induz a expressão da proteína 1 de maturação induzida por linfócito (BLIMP-1), permitindo a diferenciação de células B em células B plasmáticas a partir dos centros germinativos e de células B de memória (figura 13). Além disso, IRF4 atua na regulação da expressão de receptores de membrana e na troca de classe de anticorpo, hipermutação somática e resposta do

centro germinativo. Dessa maneira, esse fator de transcrição tem papel essencial na proliferação e sobrevivência dessas células (ASSLABER *et al.*, 2019).

Figura 13 – Esquemática da expressão de BLIMP-1 por IRF4



Fonte: adaptado de Agnarelli; Chevassut e Mancini (2018). Legenda: IRF4 age na maturação e diferenciação de células B ao induzir BLIMP-1.

Esse fator de transcrição apresenta também papel crucial nas células dendríticas, uma vez que ele estimula a apresentação de antígeno pelas células apresentadoras de antígenos ao linfócito T, além de induzir a diferenciação de macrófagos ao perfil inflamatório e bloqueia a geração de células mieloides supressoras (YANG *et al.*, 2021). Ademais, a superexpressão de IRF4 em células dendríticas inibe a ativação do inflamassoma, preservando sua capacidade de estimular as células T CD4⁺ e CD8⁺ (MCDANIEL *et al.*, 2020).

Por fim, sabe-se que o IRF4 está expresso exclusivamente em células do sistema imune, logo mutação pontual no gene responsável por codificar a proteína IRF4 faz com que ocorra um comportamento atípico desse fator de transcrição. Diversos estudos associam o polimorfismo de IRF4 com o desenvolvimento de doenças oncohematológicas, como a leucemia linfocítica crônica (LMC) e o mieloma múltiplo (SUNDARARAJ *et al.*, 2021).

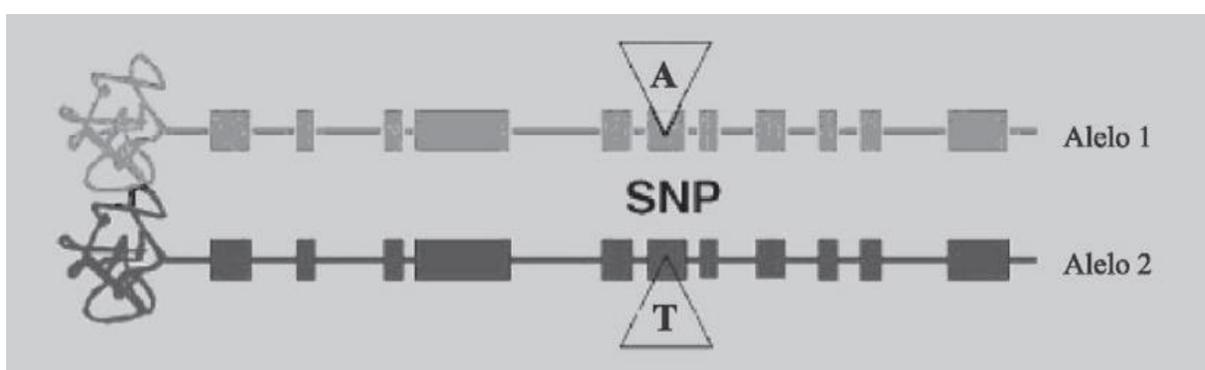
1.3 Polimorfismo genético

Polimorfismo é uma variação na sequência de DNA que ocorre em uma população numa frequência superior a 1%. A maior incidência na população sugere que é um fenômeno natural com efeito benéfico. Existem diversas classes de variação do DNA, sendo o

polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorfism - SNP*) o mais comum, acontecendo a cada 1.000 pares de base no genoma humano (ZHU; ZHOU, 2020).

SNP é uma mutação pontual que ocorre quando um único nucleotídeo é adicionado, excluído ou substituído na sequência de DNA. Por meio da genotipagem, é utilizado para encontrar a causa de uma doença genética, como a troca do aminoácido adenina por timina na anemia falciforme (figura 14), ou avaliar o prognóstico da doença em indivíduos que apresentam marcadores genéticos associados à gravidade da doença (TALL *et al.*, 2020).

Figura 14 – Polimorfismo de nucleotídeo único que acontece na anemia falciforme



Fonte: Adaptado de Visentainer *et al.*, (2008).

O estudo do SNP fornece informações importantes sobre as características genéticas do paciente e dos mecanismos de patogenicidades envolvidos, identificando marcadores potenciais de susceptibilidade e de gravidade de certas doenças. Com isso, essa ferramenta auxilia no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais efetiva para cada indivíduo, além de obter esclarecimento sobre a influência do genótipo no desenvolvimento da doença (WARD *et al.*, 2020).

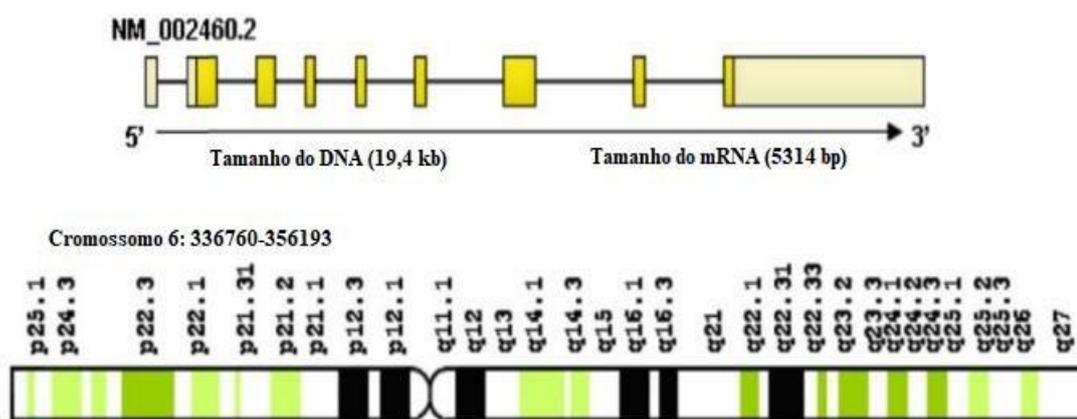
A genotipagem de SNP, como exemplo a identificação de polimorfismo no gene de IRF4 em pacientes portadores de AF, revelaram relação entre a presença do SNP e manifestações clínicas. Khorshied *et al.*, (2018) concluíram que o polimorfismo da endotelina-1, um potente peptídeo vasoconstritor produzidos pelas células endoteliais vasculares, está associado ao desenvolvimento de crises vaso-oclusivas e de complicações pulmonares em pacientes pediátricos com AF. Além disso, a presença do SNP está associada a diferentes

manifestações da AF, como AVC, úlceras de perna, hipertensão pulmonar, osteonecrose e complicações hepatobiliares (TALL *et al.*, 2020).

1.3.1 Polimorfismo no gene do IRF4 rs12203592

O gene de IRF4 está presente no cromossomo 6, na banda cromossômica p25-p23, apresentando 9 éxons e 8 íntrons (Figura 15). O SNP acontece no íntron 4, sendo a base nitrogenada citosina substituída por timina na sequência genética. Os indivíduos podem apresentar genótipo selvagem (C/C), genótipo polimórfico heterozigoto (C/T) ou genótipo polimórfico homozigoto (T/T) (POTRONY *et al.*, 2017).

Figura 15 – Localização do gene do fator regulador de interferon 4 no cromossomo 6



Fonte: Vipul e Runqing (2014). Legenda: a figura mostra a localização do gene de IRF4 no cromossomo 6 na banda cromossômica p25-p23.

A população europeia apresenta uma maior frequência do alelo T. Por sua vez, a população africana e latino-americana apresenta uma maior frequência do alelo C (NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2022). Diversos estudos relacionam mutação pontual no gene de IRF4 com o desenvolvimento de diversas doenças oncohematológicas, como a leucemia de células T do adulto (CHERIAN *et al.*, 2018).

Foram identificados diferentes polimorfismos de nucleotídeo único de IRF4. Entre eles, o SNP rs12203592 que é um fator de risco bem estabelecido para câncer de pele. Agnarelli, Chevassut e Mancini (2018) apontam que há uma maior expressão de IRF4 em células do sistema imune, desempenhando um papel vital na modulação de genes envolvidos no desenvolvimento do melanoma.

Em adição, Alamdari *et al.*, (2022) identificaram que esse fator de transcrição está envolvido na diferenciação de células T CD4⁺ virgens nos subconjuntos efetores, como as células T auxiliares Th2 e Th17. Além disso, IRF4 inibe a expressão da proteína de morte celular programada (PD-1) e Helios, que estão envolvidos com a morte celular induzida de linfócito T e na diferenciação de células T para T regulatórias (Treg) respectivamente, aumentando as respostas mediadas por células T e as protegendo da apoptose. Portanto, esses indivíduos apresentam células T com capacidade funcional inferior, sendo mais propensos ao desenvolvimento de complicações.

Estudos de Asslaber *et al.*, (2019) identificaram que o SNP de IRF4 em camundongos transgênicos com leucemia linfocítica crônica(LLC) semelhantes com a doença humana foram relacionados a uma maior susceptibilidade à LLC. A deleção de IRF4 específico para células T foram associadas a um pior prognóstico, contribuindo para o estabelecimento da doença. Dessa maneira, o polimorfismo de IRF4 regula negativamente genes envolvidos com a ativação das células imunes. Nas células T, a deleção de IRF4 específico para CD4⁺ foi associado a defeitos na apresentação de antígeno por APC, enquanto a redução de CD8⁺ contribuiu com o estabelecimento de infecções crônicas.

Em adição, Cherian *et al.*, (2018) revelaram que o polimorfismo de IRF4 apresentou alterações nas vias do receptor de células T, na expressão de CD28 e de NF-κB. Eles concluíram que o alelo T leva a superexpressão de IRF4 em células do sistema imune, favorecendo o crescimento e expansão clonal de linfócitos T.

Embora muitos estudos tenham associado IRF4 a diversas doenças, como melanoma múltiplo e leucemia linfocítica crônica, poucos têm relacionado esse SNP com anemia falciforme. Todavia, acredita-se que o polimorfismo de IRF4 está associado com o desenvolvimento de complicações grave na AF, uma vez que o fator regulador de interferon 4 participa da diferenciação e maturação de células do sistema imune, além de modular genes importantes que participam da imunopatogenicidade dessa doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a frequência do polimorfismo de nucleotídeo único no gene do fator regulador de interferon 4 na região rs12203592 e sua associação com biomarcadores de hemólise, inflamação, renais e hepáticos e com manifestações clínicas da anemia falciforme.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com anemia falciforme.
- Determinar a frequência do polimorfismo rs12203592 na população estudada e associar o genótipo e o alelo com marcadores de hemólise, inflamatórios (IFN- γ), hematológicos, de lesões renais e hepáticos e com manifestações clínicas da AF
- Comparar os níveis séricos de IFN- γ na população estudada
- Associar o genótipo e o alelo com HbF e com as complicações clínicas da AF
- Correlacionar IFN- γ e HbF com indicadores de hemólise e de lesões hepáticas e renais.
- Investigar o potencial de HbF e IFN- γ associado ao polimorfismo como indicadores de prognóstico da AF.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho de Estudo

Trata-se de um estudo transversal, analítico e descritivo de pacientes com anemia falciforme, realizado no período de junho de 2021 a junho de 2022.

3.2 Local da Pesquisa

O presente trabalho teve como local de pesquisa o Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE). Essa instituição foi fundada no ano de 1983 com a finalidade de atender a demanda transfusional de pacientes do estado do Ceará. Atualmente, atende cerca de 500 unidades de saúde de todo o estado, estando presente em Fortaleza e no interior do estado. A hemorrede estadual garante a cobertura transfusional a todos os leitos do SUS no estado, além de atendimento a outras demandas de saúde, totalizando mais de 18.000 leitos atendidos (HEMOCE, 2022).

3.3 Casuística

No estado do Ceará, o HEMOCE atende 377 pacientes com doença falciforme, sendo desses 195 com anemia falciforme. Em adição, no ano de 2022, essa instituição recebeu 100.380 doações de sangue, sendo mais de 50% das doações realizadas no hemocentro de Fortaleza (SECRETARIA DA SAUDE, 2023). Dessa maneira, no presente estudo, após ser avaliados os critérios de inclusão e exclusão da pesquisa (item 3.4 e 3.5), foram inseridos 98 pacientes com anemia falciforme e 79 voluntários saudáveis de sangue no estudo.

A população foi dividida em dois grupos: anemia falciforme (n=98) e controle (n=79). O grupo com anemia falciforme é composto por pacientes adultos com diagnóstico de anemia falciforme (HbSS) confirmado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em acompanhamento ambulatorial no HEMOCE. Por outro lado, o grupo controle é constituído de indivíduos adultos saudáveis (HbAA) que se apresentaram de forma voluntária e espontânea para doar sangue na referida instituição e que não apresentavam HbS quando realizado a eletroforese de hemoglobina.

Os grupo foram estratificados de acordo com o genótipo [genótipo selvagem (CC), genótipo polimórfico heterozigoto (CT), genótipo polimórfico homozigoto (TT)] e com o alelo

[(alelo C (selvagem) e alelo T(polimórfico)]. Além disso, os pacientes com anemia falciforme foram estratificados quanto ao uso de hidroxiureia.

3.3.1 Cálculo amostral

A fórmula abaixo foi utilizada para estimar a proporção de uma variável dicotômica numa população (FONTELLES; SIMÕES; ALMEIDA, 2010):

$$n = \frac{P(1 - P) \cdot Z^2_{\alpha/2}}{(p - P)^2}$$

Onde: $P(1 - P)$ representa a variância das proporções na população; $(p - P)$ a diferença mínima a ser detectada entre o valor da proporção esperada (p) e o verdadeiro valor na população (P); $Z^2_{\alpha/2}$ é igual a 1,96. Logo, ao considera que (p) é igual a frequência do alelo T na américa latina (0,139) (National Library of Medicine, 2023) e que $(p - P)$ é igual a 0,05; estima-se que 87 pessoas representam a população analisada.

$$n = \frac{0,060 [(1 - 0,060) \cdot 1,96^2]}{0,05^2} = 87 \text{ pessoas}$$

3.4 Critério de inclusão e exclusão do grupo com anemia falciforme

Foram incluídos no grupo com anemia falciforme os pacientes adultos com anemia falciforme que se encontravam em estado estacionário de Ballas (2009): ausência de quadro infeccioso ou inflamatório nas quatro semanas anteriores à inclusão no estudo, ausência de admissão hospitalar nos 2-3 dias anteriores e ausência de transfusão sanguínea nos quatro meses precedentes a coleta. Por outro lado, foram excluídos os pacientes que se autodeclaravam hipertensos, diabéticos e gestantes.

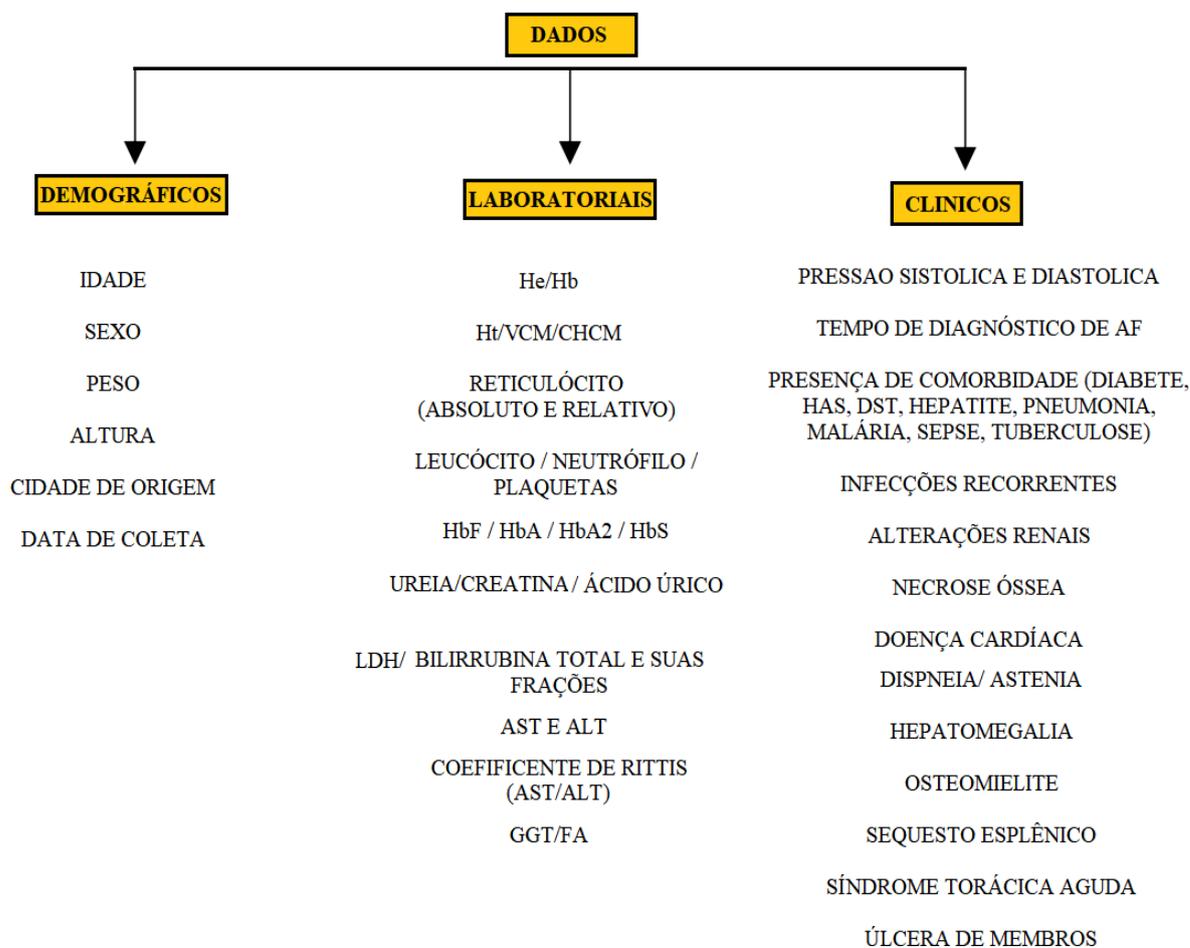
3.5 Critério de inclusão e exclusão do grupo controle

Foram incluídos as pessoas adultas, com idade entre 18 e 65 anos, de ambos os sexos, sem diagnóstico de anemia falciforme e que se apresentaram de forma espontânea para doar sangue no HEMOCE. Foram excluídos aqueles que se autodeclaravam hipertensos, diabéticos e gestantes.

3.6 Coleta de dados e de amostra

As informações sociodemográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com anemia falciformes foram obtidas dos prontuários médicos presentes no ambulatório do HEMOCE (figura 16). As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos vacutainer® com e sem anticoagulante (ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA). A alíquota de soro foi utilizada para realizar a dosagem dos níveis de IFN- γ pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), enquanto a de sangue total foi usada para obter a extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) e, posteriormente, a identificação do polimorfismo de nucleotídeo único rs12203592 por reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR).

Figura 16 – Variáveis clínicas e laboratoriais dos pacientes com anemia falciforme



Legenda: Hemácia (He), Hemoglobina (Hb), Hematócrito (Ht), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM); Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); Hemoglobina F (HbF); Hemoglobina A (HbA2), Hemoglobina A2 (HbA2); Hemoglobina S (HbS), Aspartato transferase (AST), Alanina transferase (ALT); gamaglutamiltransferase (GGT); Fosfatase alcalina (FA); Lactato Desidrogenase (LDH); Coeficiente de Rittis é a relação entre AST/ALT; Hipertensão (HAS); Doença Sexualmente Transmissível (DST).

As amostras da população estudada foram analisadas no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHGDH) do Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará em parceria com o Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) e com Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica da UFC.

3.7 Avaliação Laboratorial

Os dados laboratoriais foram obtidos dos prontuários médicos da referida instituição. Os parâmetros hematológicos foram obtidos dos hemogramas realizados por meio automatizado no analisador CELL-DYN Ruby (Abbott®, USA). Os níveis dos tipos de hemoglobina (HbF, HbA, HbA2 e HbS) foram obtidos por meio da metodologia de HPLC no equipamento ULTRA 2™ (Trinity Biotech®, Brazil) e por eletroforese de gel ágar-amido pH 8,6. Os marcadores renais (ureia, ácido úrico) e creatinina foram obtidos por meio dos métodos enzimáticos e cinéticos no analisador AU680 (Beckman Coulter®, USA) respectivamente. Em adição, os marcadores de hemólise (bilirrubina total, direta e LDH) foram determinadas por espectrofotometria no analisador AU680 (Beckman Coulter®, USA). Os níveis de bilirrubina indireta foram obtidos a partir da subtração dos níveis de bilirrubina total com a direta. Além disso, foi determinado a atividades das seguintes enzimas por métodos colorimétricos: AST, ALT, GGT e FA no analisador AU680 (Beckman Coulter®, USA).

3.7.1 Determinação dos níveis de interferon-gama

A técnica utilizada para dosar os níveis plasmático de IFN- γ no soro dos pacientes foi ELISA sanduíche, sendo utilizado o Kit de ELISA sanduiche comercial (número de catálogo: DY285B; R&D Systems®, Inc., USA). Em suma, esta técnica baseia-se na ligação do IFN- γ com o anticorpo de captura presente no poço da microplaca. Em seguida, é adicionado o segundo anticorpo que se liga ao IFN- γ . Uma solução contendo o substrato é adicionada, o qual reage com o complexo enzima-anticorpo-IFN- γ , levando a mudança da cor da solução por meio de reações enzimáticas. A intensidade da coloração é diretamente proporcional à concentração de IFN- γ presente no soro do paciente.

O procedimento consiste, inicialmente, na sensibilização da placa pelo anticorpo de captura. Esse foi diluído em 1 ml do tampão fosfato-salino (Phosphate-buffered Saline- PBS) na concentração de 720 $\mu\text{g/mL}$. O volume foi ajustado para uma concentração de trabalho de 4

$\mu\text{g/mL}$, o qual foi retirado 100 μL por poço. Com isso, a placa foi coberta com plástico filme e deixada *overnight*. No dia seguinte, lavou-se com 400 μL de *Wash buffer* [0,5 mL de Tween20 para 1 L de PBS], sendo em seguida secada. Em seguida, bloqueou-se com 300 μL de diluente de reagente [10 g de albumina sérica bovina (BSA) para 1 L de PBS], incubando por uma hora em temperatura ambiente e sendo novamente lavada com *Wash buffer*.

Posteriormente, foi adicionado 100 μL do padrão e 100 μL das amostras nos poços e cobertos com plástico filme, sendo incubadas por duas horas em temperatura ambiente. Após esse tempo, secou-se e lavou com 400 μL de *wash buffer*. Adicionou-se 100 μL de anticorpo de detecção, cobriu-se e esperou por 2 horas, sendo novamente lavada com 400 μL de *wash buffer*. Em seguida, adicionou-se 100 μL da solução de estreptavidina – HRP e esperou por 20 minutos. Posteriormente, acrescentou-se 100 μL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) no escuro e esperou-se por 20 minutos, sendo em seguida adicionada 50 μL da solução de parada [H_2SO_4 (2N)]. Por fim, leu-se em 450 nm com correção para 570 nm.

3.8 Genotipagem do polimorfismo do fator regulador de interferon 4 na região rs12203592

3.8.1 Isolamento de DNA do leucócito

Em cada eppendorf, adicionou-se 400 μl de sangue total mais 800 μl de uma solução de lise gelada (SDH®) (LabTest, Brazil). Em seguida, homogeneizou por 30 segundos no vórtex e centrifugou por 10 minutos em 3500 rpm a 4°C. Com isso, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 250 μl PBS e 750 μl de trizol LS Reagent® (*Invitrogen*, EUA), deixando por 1 hora no -80°.

O próximo passo do procedimento foi adicionar 200 μl de clorofórmio, agitando por 15 segundos no vórtex e mantendo por 3 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se por 25 minutos em 5000 rpm a 4°C. Depois, acrescentou, em cada tubo contendo a fase orgânica, 500 μl de *Back Extration Buffer* (BEB). Por 1 minuto homogeneizou no vórtex e incubou por 30 minutos no agitador de placa a -25°C. A seguir, centrifugou-se por 15 minutos em 5000 rpm a 4°C, transferindo o sobrenadante para um novo tubo. Nesse adicionou-se 400 μl de isopropanol, homogeneizando por inversão e incubando por 1 hora a -20°C. Por fim, centrifugou-se por 30 minutos em 1400 rpm a 4°C, desprezando o sobrenadante.

O *pellet* obtido foi lavado com 100 µl de etanol absoluto gelado, sendo em seguida homogeneizado levemente por piparotes e centrifugando por 15 minutos em 1400 rpm a 4°C. Esse passo foi repetido 2 vezes. Por fim, o sobrenadante foi descartado, invertendo o tubo e o deixando-o nessa posição para secar o *pellet*. Quando esse estiver totalmente seco, adicionou-se 20 µl de água milli-Q®. Por fim, para avaliar a qualidade do DNA extraído, as amostras de DNA foram analisadas no aparelho Nanodrop (Qiagen), onde a relação entre a quantidade de DNA e proteínas foi aferida. As amostras que continham valores dessa relação entre 1,7 e 2,0 foram consideradas aceitáveis a serem submetidas a identificação do polimorfismo pela metodologia de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

3.8.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

O ensaio de genotipagem da TaqMan® SNP *Genotyping Assay* (número de catálogo: 4351379; *AppliedBiosystems*®, California, USA) usa a TaqMan 5'-nuclease para amplificar e detectar polimorfismo específicos em amostras de DNA genômico purificado. É constituída de duas sondas. Uma sonda é marcada com o fluoróforo VIC® (emite cor verde) para detectar a sequência do alelo 1 (genótipo selvagem) e a segunda com fluoróforo FAM® (emite cor azul) para detectar o alelo 2 (genótipo polimórfico) (quadro 1). Por conseguinte, os fluoróforo, conforme os produtos do PCR iam sendo produzidos, emitiram um sinal fluorescente que identificava os alelos, possibilitando a genotipagem do polimorfismo.

Quadro 1 – Ligação da sequência genética com a sonda marcada com o fluoróforo

Fluoróforo	
VIC® (Verde)	FAM® (Azul)
3'- GGG – GGC – CGG – GGT – 5'	3'- GGG – GAC – CGG – GGT – 5'
Alelo	
Selvagem (C)	Polimórfico (T)
5' - CCC – CCG – GCC – CCA - 3'	5' - CCC – CTG – GCC – CCA – 3'

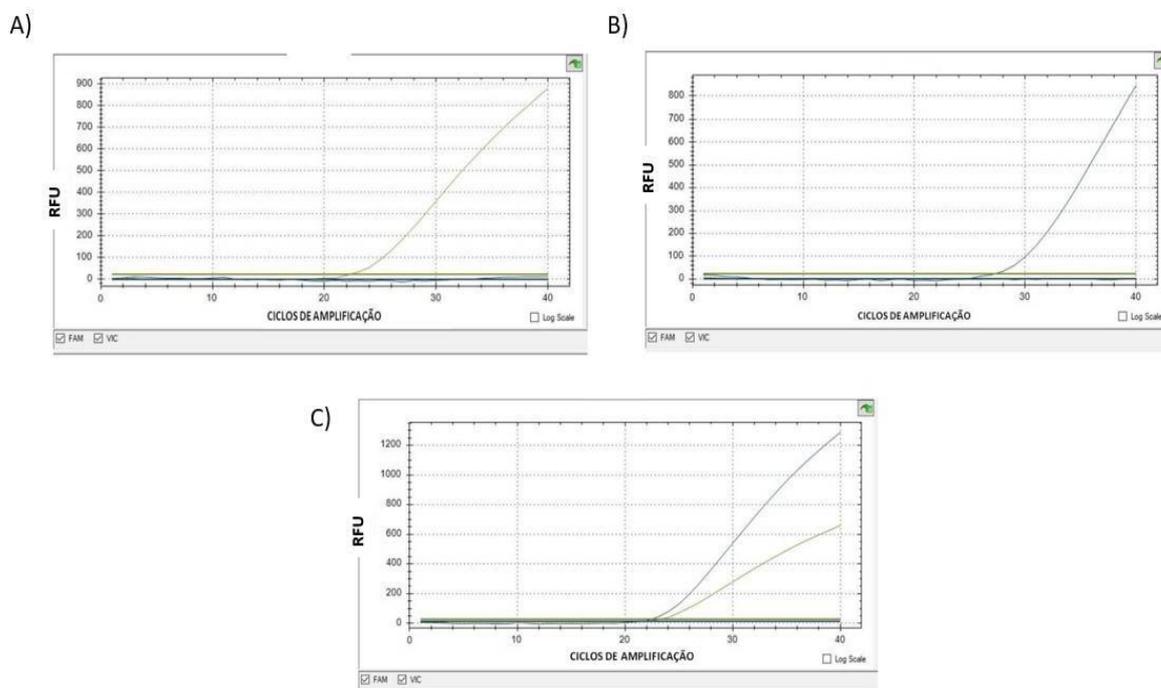
Fonte: adaptado Mertens, Ramadori, Mihm (2010).

A genotipagem foi realizada por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR). Antes da manipulação das amostras e dos reagentes, foi realizado a limpeza da capela de fluxo laminar (Simblab, Inc., Brazil) com álcool 70% seguida por

iluminação ultravioleta por 15 minutos. Foram separados para o procedimento: pipetas de 1000, 200 e 10 μ l; eppendorf, placa de PCR, selo adesivo para placa de PCR, amostras e as sondas TaqMan® SNP de IRF4.

Na placa de PCR, foi adicionado 2 μ l de DNA extraído do sangue periférico dos pacientes. Em seguida, acrescentou-se 0,25 μ l da sonda TaqMan® SNP de IRF4 e 5 μ l de TaqMan master mix® na mistura. Em seguida, adicionou-se 2,75 μ l de água livre de DNase. A placa foi introduzida no equipamento de qPCR [aparelho CFX96 *Real-time System* (Bio-Rad Laboratories®, Inc., Hercules, California, USA)]. O protocolo utilizado no termociclador foi dividido em três etapas: Inicialmente, a amostra fica incubando numa temperatura de 50°C por 2 minutos, seguida de 95°C por 10 minutos para ativar a DNA polimerase. A etapa seguinte consiste na desnaturação do DNA numa temperatura de 95°C por 15 segundos seguida das etapas de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto, sendo repetido esse ciclo 40 vezes. O resultado da discriminação alélica foi representado em gráfico pelo programa Bio-Rad CFX Manager 3.1 System Software (figura 17).

Figura 17 - Curvas características das reações dos fluoróforos VIC®(cor verde) e FAM®(cor azul)



Fonte: Próprio autor. Legenda: a figura representa a distribuição alélica obtidos pela reação de cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) com o uso de sonda Taqman®. É visualizada as curva características das reações dos fluoróforos VIC, que se liga ao alelo C, e FAM, que se liga ao alelo T. A figura 12A expressa a presença do genótipo selvagem (C/C), a 12B o genótipo polimórfico homocigoto (T/T) e a 12C o genótipo polimórfico heterocigoto (C/T). RFU= unidade de fluorescência.

3.9 Análise estatística

Os dados foram coletados e organizados em planilha no programa Microsoft® Excel (2019). As análises estatísticas foram obtidas dos programas IBM-SPSS na versão 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e GraphPad Prism na versão 6, conforme o quadro 2.

Quadro 2 – Variáveis utilizadas em cada teste analítico

Análise estatística	
Variáveis	Teste estatístico
Grupo x Genótipo	Teste de qui-quadrado
Grupo x IFN- γ	Teste T não pareado
Genótipo x IFN- γ	Teste One-way Anova com pós teste de Tukey
Genótipo x Parâmetros hematológicos	
Tipos de hemoglobina x Genótipo	
HbF x IFN- γ	
Alelo x IFN- γ	Teste T não pareado
Alelo x Parâmetros hematológicos	
Tipos de hemoglobina x Alelo	
Parâmetros laboratoriais x Genótipo	Regressão logística
Parâmetros bioquímicos x Genótipo	Teste One-way Anova com pós teste de Tukey
IFN- γ x Parâmetros bioquímicos	Coefficiente de correlação de Pearson
HbF- γ x Parâmetros bioquímicos	Coefficiente de correlação de Pearson
Genótipo x HU x Grupo	Modelo Linear Geral
HbF	Curva ROC
IFN- γ	
Frequência das complicações clínicas x Grupo	Teste do qui-quadrado
HbF x Grupo x HbF	Regressão logística binária

Fonte: Próprio autor. Legenda: Hemoglobina F(HbF), Hidroxiureia (HU), interferon-gama (IFN- γ).

Para avaliar a distribuição das variáveis, foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk e de Levene. Os testes T não pareado e qui-quadrado foram usados para variáveis independentes contínuas e categorias respectivamente. O teste de variância ANOVA one-way com pós-teste de Tukey e o modelo linear geral usaram as seguintes variáveis: parâmetros laboratoriais, uso de hidroxiureia e genótipo. A correlação de Pearson foi realizada para se avaliar a relação de HbF e IFN- γ com parâmetros laboratoriais. Já a análise de regressão logística binária foi utilizada para estimar a razão de chances (*odds ratio*) para as variáveis associadas a um quadro clínico mais grave na anemia falciforme. Em adição, a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic* - ROC) foi utilizada para se avaliar a sensibilidade e a especificidade dos níveis de IFN- γ e HbF.

As frequências genéticas dos alelos C (selvagem) e T (polimórfico) do polimorfismo de nucleotídeo único rs12203592 foram verificadas em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) através do programa HW_TEST, aplicando-se o teste de qui-quadrado de Pearson (SANTOS; LEMES; OTTO, 2020). Os dados foram expressos como média \pm EPM. O nível de significância estatística utilizado nas análises estatísticas foi de $p < 0,05$.

3.10 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do centro de pesquisa em hemoglobinopatias do HEMOCE, sendo aprovado conforme o parecer nº 6.185.474 (Anexo A). O presente trabalho obedeceu aos princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Os pacientes que concordaram em participar da pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

4 RESULTADOS

4.1 Análises dos dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com anemia falciforme

Dos 98 pacientes com anemia falciforme, 59 indivíduos (60,2%) eram do sexo feminino e 39 (39,8%) masculino. A idade média era de 32 anos. Em relação a cidade de origem, 55 (56,2%) pacientes moravam no interior do estado, sendo necessário o deslocamento para Fortaleza para receber o tratamento adequado. Ademais, o tempo médio de diagnóstico da doença era de 22 anos e 69 (70,4%) pacientes utilizavam hidroxiureia como fármaco de primeira escolha para o tratamento da AF (tabela 1).

Tabela 1– Parâmetros sociodemográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com anemia falciforme

Parâmetros sociodemográficos, clínicos e laboratoriais (N=98)	Número absoluto (%) ou média (máximo ou mínimo)	Amplitude
Sexo		
Masculino	39 (39,8%)	
Feminino	59 (60,2%)	
Idade (anos)	32	18-68
Cidade de origem		
Fortaleza	41 (41,8%)	
Interior do estado do Ceará	55 (56,2%)	
Outros estados	2 (2,0%)	
Tempo de diagnóstico (anos)	22	2-49
Uso de hidroxiureia		
Sim	69 (70,4%)	
Não	29 (29,6%)	

Nota: os valores foram expressos como número absoluto (%) ou média (mínimo e máximo).

4.2 Determinação da frequência do Polimorfismo rs12203592 na população estudada

Foram identificados os genótipos e os alelos do gene de IRF-4 da população estudada. Do total, 153 (86,4%) apresentavam o genótipo selvagem (C/C), 18 (10,2%) genótipo polimorfo heterozigoto (C/T) e 6 (3,4%) genótipo polimorfo homozigoto (T/T). Dentre os pacientes com anemia falciforme, notou-se que 12 pessoas (12,2%) apresentaram genótipo C/T, 5 (5,1%) genótipo T/T e 81 (82,7%) genótipo C/C. Ademais, foi avaliado também se os grupos apresentavam as frequência dos genótipos e dos alelos semelhantes, tendo como finalidade avaliar se o polimorfismo estaria vinculado a AF. Diante disso, verificou-se que não houve diferença entre os grupos, indicando que esses apresentavam o mesmo perfil quanto ao perfil genético ($p=0,218$) (tabela 2).

Tabela 2 - Frequência do polimorfismo rs12203592 na população estudada

	Genótipos			Total	C	T
	C/C	C/T	T/T			
Controle	72 (91,1%)	6 (7,6%)	1 (1,3%)	79 (100%)	148 (46%)	8 (26,7%)
Paciente	81 (82,7%)	12 (12,2%)	5 (5,1%)	98 (100%)	174 (54%)	22 (73,3%)
Total	153 (86,4%)	18 (10,2%)	6 (3,4%)	177 (100%)	322 (100%)	30 (100%)
p		0,218			0,054	

Legenda: Genótipo polimorfo heterozigoto (C/T), Genótipo polimorfo homozigoto (T/T) e Genótipo selvagem (C/C). Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Alelo C: referência; Alelo T: mutado. Nota: Teste de qui-quadrado; * $p<0,001$.

4.3 Determinação do equilíbrio de Hardy-Weinberg

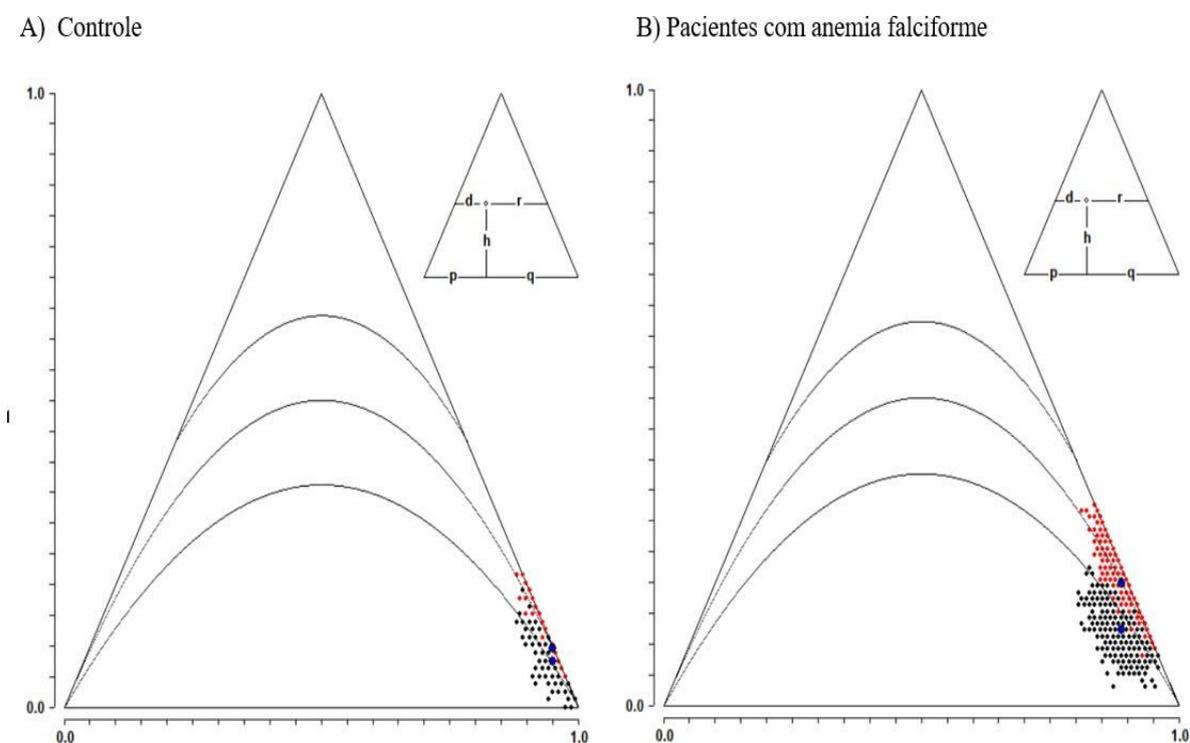
As frequência genotípica e alélica na população estudada foram avaliadas com a finalidade de avaliar se as frequências estão em equilíbrio com o princípio de Hardy-Weinberg. Diante disso, notou-se que a população estudada não se encontra em equilíbrio com o princípio de Hardy-Weinberg (* $p<0001$), indicando que os fatores evolutivos atuam na frequência do polimorfismo na população avaliada (tabela 3, figura 18).

Tabela 3 - Frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs12203592 nos pacientes com anemia falciforme e controle

SNP rs12203592				
Genótipo	Controle		Pacientes com anemia falciforme	
	N: 79	FG(%)	N: 98	FG(%)
CC	72	91,1	81	82,7
CT	6	7,60	12	12,2
TT	1	1,30	5	5,1
Alelos	N: 79	FA(%)	N: 98	FA(%)
C	148	94,9	174	88,8
T	8	5,1	22	11,2
p	<0,0001			

Legenda: Genótipo polimorfo heterozigoto (C/T), Genótipo polimorfo homozigoto (T/T) e Genótipo selvagem (C/C). Frequência alélica (FA). Frequência genotípica (FG). Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Nota: Teste de qui-quadrado; *p<0,001.

Figura 18 – Determinação do equilíbrio de Hardy-Weinberg para SNP rs12203592 na população estudada

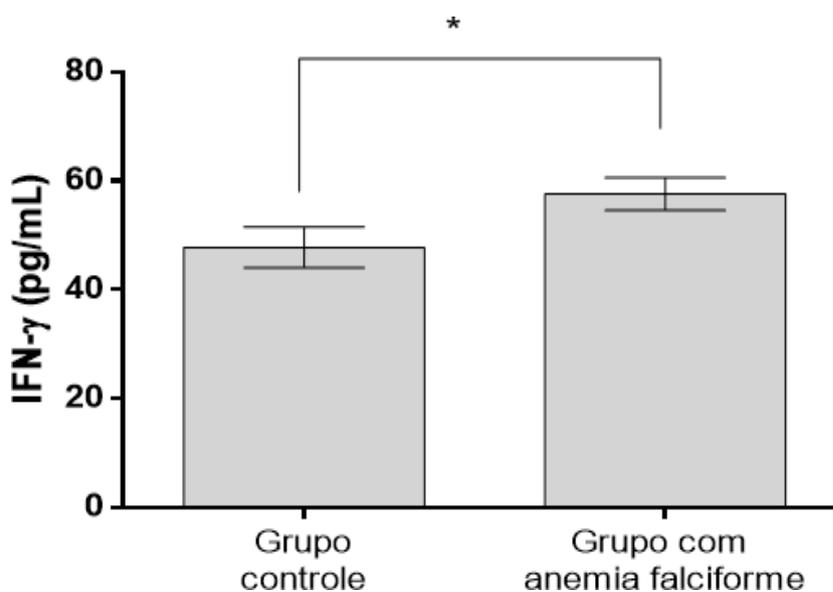


Legenda: Gráfico ternário do equilíbrio de Hardy-Weinberg para SNP rs12203592 no grupo controle (Figura 18A) e no grupo com anemia falciforme (figura 18B). Os pontos vermelhos esquematizam a distribuição genotípica esperada e os pontos pretos os observados.

4.4 Análise dos níveis séricos de interferon-gama na população estudada

Considerando que a frequência do polimorfismo não teve diferença entre os grupos controle e com anemia falciforme, foi avaliado se a presença de AF interfere nos níveis séricos de interferon- γ , uma vez que essa citocina se apresenta elevada em processos inflamatórios crônicos. Diante disso, notou-se diferença dos níveis plasmáticos de IFN- γ entre os grupos controle e com anemia falciforme (*p= 0,039), indicando que, em média, o grupo com anemia falciforme ($57,6 \pm 2,99 \mu\text{g/mL}$) apresentou maiores concentrações plasmáticas de IFN- γ em comparação ao grupo controle ($47,8 \pm 3,75 \mu\text{g/mL}$), resultando num aumento percentual de 17% (figura 19).

Figura 14 – Comparação dos níveis séricos de interferon-gama entre pacientes e controle

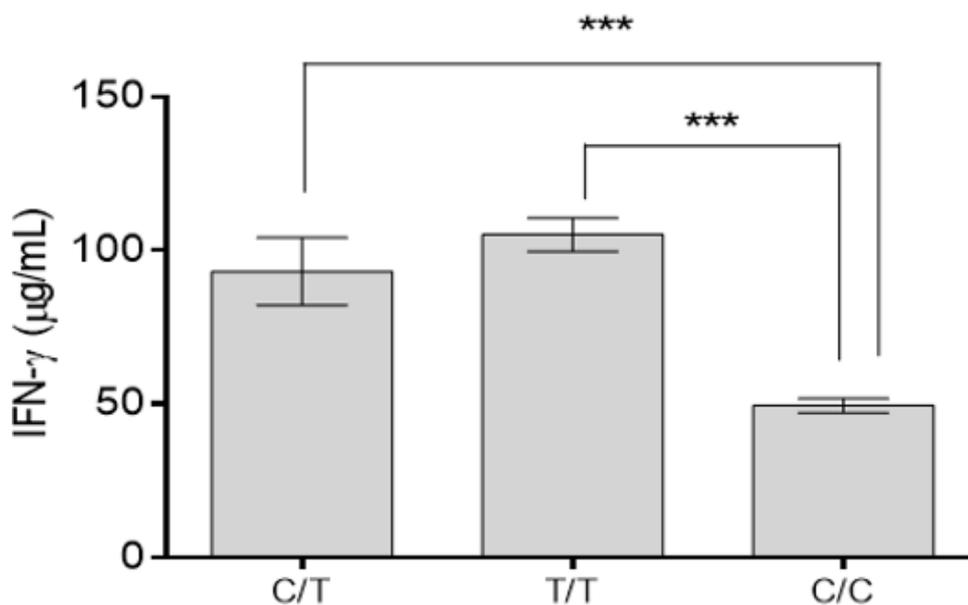


Legenda: IFN- γ : interferon gama. Nota: *p= 0,039, Teste T não pareado.

4.5 Níveis séricos de Interferon-gama de acordo com o genótipo nos pacientes com anemia falciforme

Sabendo que os pacientes com anemia falciforme apresentaram maiores concentrações de IFN- γ que o controle, decidiu-se verificar se o polimorfismo de nucleotídeo único no gene de IRF4 interfere nos níveis dessa citocina. Para isto, o grupo com anemia falciforme foi estratificado em grupos de acordo com o genótipo, sendo as concentrações séricas de IFN- γ comparadas de acordo com o perfil genético de cada grupo (figura 20).

Figura 15 – Comparação dos níveis séricos de interferon-gama de acordo com o genótipo nos pacientes com anemia falciforme



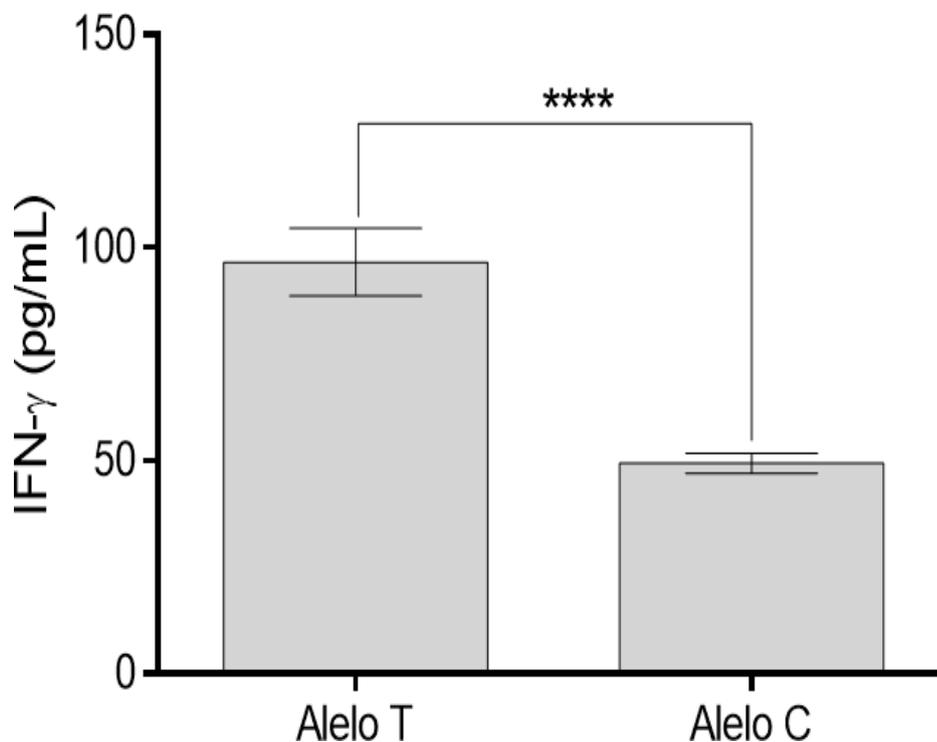
Legenda: Genótipo polimorfo heterozigoto (C/T), Genótipo polimorfo homozigoto (T/T), Genótipo selvagem (C/C); IFN- γ : interferon gama. Nota: ****p < 0,001, teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Diante disso, quando se comparou os níveis dessa citocina entre os grupos com genótipo polimorfo, C/T ($93,1 \pm 11,0 \mu\text{g/mL}$) e T/T ($105 \pm 5,40 \mu\text{g/mL}$), e selvagem ($49,4 \pm 2,37 \mu\text{g/mL}$) observou-se diferença (****p < 0,001), principalmente no grupo T/T que teve mais do que o dobro das concentração do grupo selvagem. Todavia, não foi observada diferença quando comparou os grupos polimorfos entre si, visto que os dois grupos apresentaram valores próximos um do outro.

4.6 Níveis séricos de interferon-gama de acordo com os alelos nos pacientes com anemia falciforme

Sabendo que os grupos polimorfos (C/T e T/T) apresentaram maiores concentrações de IFN- γ que o selvagem (C/C), verificou-se o alelo polimórfico (T) interfere nos níveis de IFN- γ . Para isto, os pacientes com anemia falciforme foram divididos em grupos em relação ao alelo. Diante disso, notou-se diferença entre os grupos (****p < 0,0001). O grupo contendo o alelo T ($96,6 \pm 7,9 \mu\text{g/mL}$) apresentou maiores concentrações séricas de IFN- γ em comparação com o grupo contendo o alelo C ($49,4 \pm 2,37 \mu\text{g/mL}$) (figura 21).

Figura 16 – Comparação dos níveis séricos de interferon-gama de acordo com os alelos nos pacientes com anemia falciforme



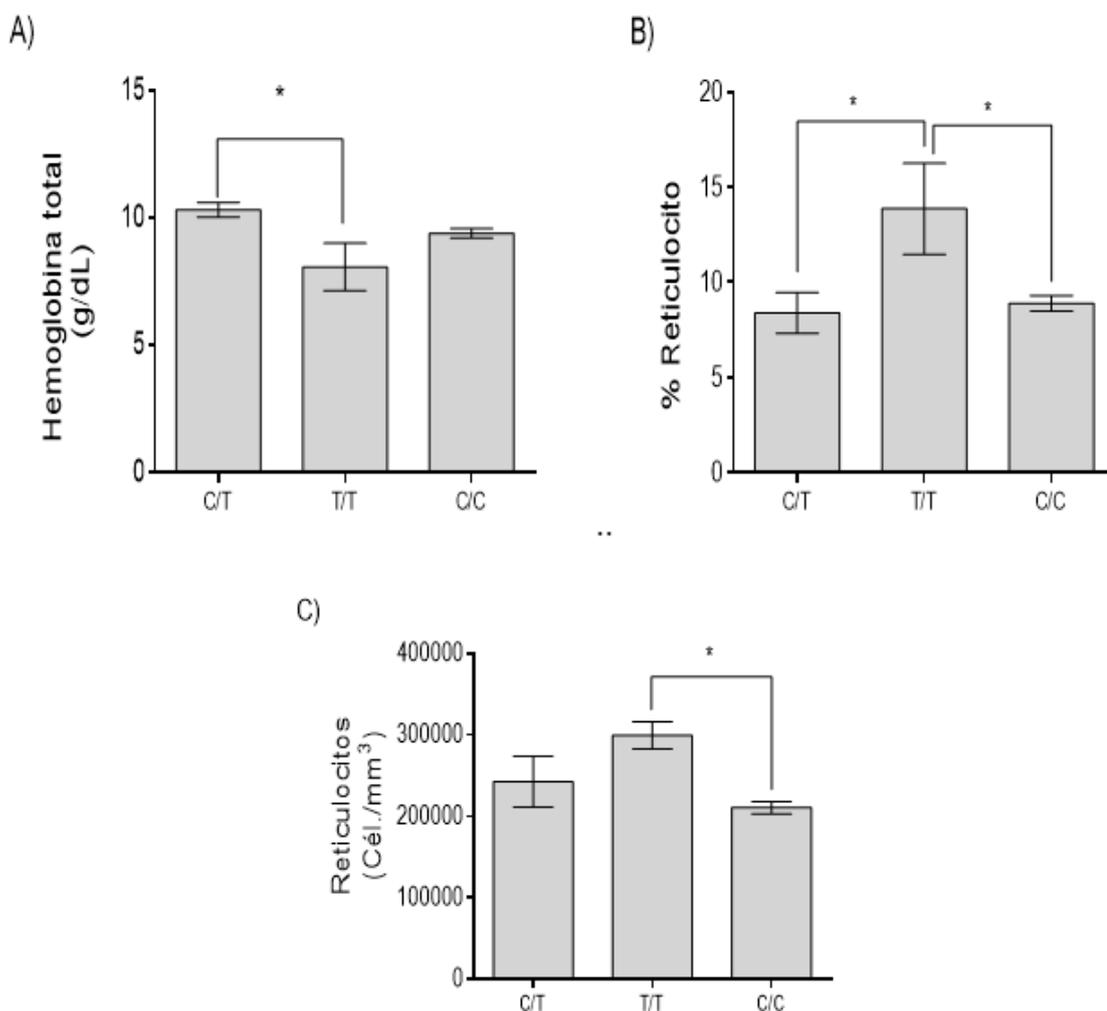
Legenda: Alelo T: presença do polimorfismo rs12203592; Alelo C: ausência do polimorfismo rs12203592; IFN- γ : interferon gama. Nota: ****p \leq 0,0001, teste T não pareado.

4.7 Análise da influência dos genótipos nos parâmetros hematológicos nos pacientes com anemia falciforme

Considerando que o genótipo influencia nos níveis séricos de interferon-gama, decidiu-se verificar também se ele apresenta influência nos parâmetros hematológicos. Diante disso, notou-se que os parâmetros hemoglobina (*p=0,042), reticulócitos (*p=0,026) e porcentagem de reticulócitos (*p=0,024) apresentaram diferença de acordo com o genótipo.

O grupo polimorfo heterozigoto (C/T) apresentou maiores concentrações de hemoglobina ($10,3 \pm 0,29$ milhões / mm^3) quando comparado ao grupo polimorfo homozigoto (T/T) ($8,07 \pm 0,93$ milhões / mm^3). Além disso, os grupos C/T (242408 ± 31277 células/ mm^3 ; $8,38 \pm 1,08\%$) e C/C (210735 ± 7533 células/ mm^3 ; $8,89 \pm 0,41\%$) apresentaram valores tanto absoluto quanto relativo de reticulócitos menores em comparação com o grupo T/T (299525 ± 16625 células/ mm^3 ; $13,9 \pm 2,39\%$) (figura 22).

Figura 17 – parâmetros hematológicos de acordo com o genótipo

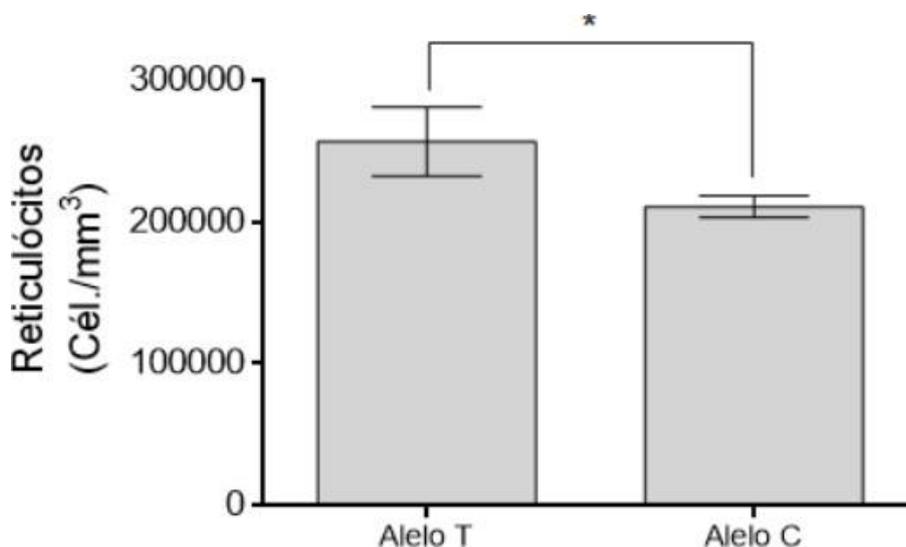


Legenda: Genótipo polimorfo heterozigoto (C/T), Genótipo polimorfo homozigoto (T/T), Genótipo selvagem (C/C). Nota: teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey, *p<0,05.

4.8 Análise da influência dos alelos nos parâmetros hematológicos nos pacientes com anemia falciforme

Considerando que o genótipo influencia nos parâmetros hematológicos, verificou-se os alelos influência nesses indicadores biológicos. Diante disso, observou-se que os valores de reticulócitos absoluto (*p=0,021) apresentaram diferenças de acordo com os alelos. O grupo contendo pacientes com alelo T (256688 ± 24344 células/mm³) apresentaram maiores valores absolutos de reticulócito em comparação com o grupo contendo pacientes com alelo C (210735 ± 7533 células/mm³) (figura 23).

Figura 1819 – Comparação dos parâmetros hematológicos de acordo com os alelos nos pacientes com anemia falciforme



Legenda: Alelo T: presença do polimorfismo no gene de IRF 4; Alelo C: ausência do polimorfismo no gene de IRF 4. Nota: * $p=0,021$, teste T não pareado.

4.9 Análise da influência do genótipo e do alelo nos tipos de hemoglobina em todos os pacientes com anemia falciforme

Comparou-se também se os níveis dos tipos de hemoglobina sofrem influência do genótipo e dos alelos, obtendo diferença entre os grupos (** $p<0,001$). Os grupos C/T ($11,8 \pm 1,03\%$) e T/T ($10,7 \pm 1,71\%$) apresentaram menores concentrações de HbF em comparação com C/C ($19,2 \pm 0,91\%$) (tabela 4). Além disso, o grupo contendo pacientes com alelo C ($11,5 \pm 0,87\%$) apresentaram maiores concentrações de HbF em comparação com o grupo contendo pacientes com alelo T ($19,3 \pm 0,91\%$) (tabela 5).

Tabela 4- Tipos de hemoglobina de acordo com o genótipo nos pacientes com anemia falciforme

SNP rs12203592				
Parâmetro	C/T	T/T	C/C	P
HbF (%)	$11,8 \pm 1,03$	$10,7 \pm 1,71$	$19,2 \pm 0,91$	$<0,001^{**}$
HbA2 (%)	$3,49 \pm 0,23$	$3,08 \pm 0,20$	$3,36 \pm 0,060$	0,392
HbS (%)	$81,5 \pm 1,41$	$79,5 \pm 3,05$	$79,2 \pm 1,19$	0,745

Legenda: Genótipo polimorfo heterozigoto (C/T), Genótipo polimorfo homozigoto (T/T) e Genótipo selvagem (C/C). Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Nota: * $p<0,05$. teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Tabela 5- Tipos de hemoglobina de acordo com os alelos nos pacientes com anemia falciforme

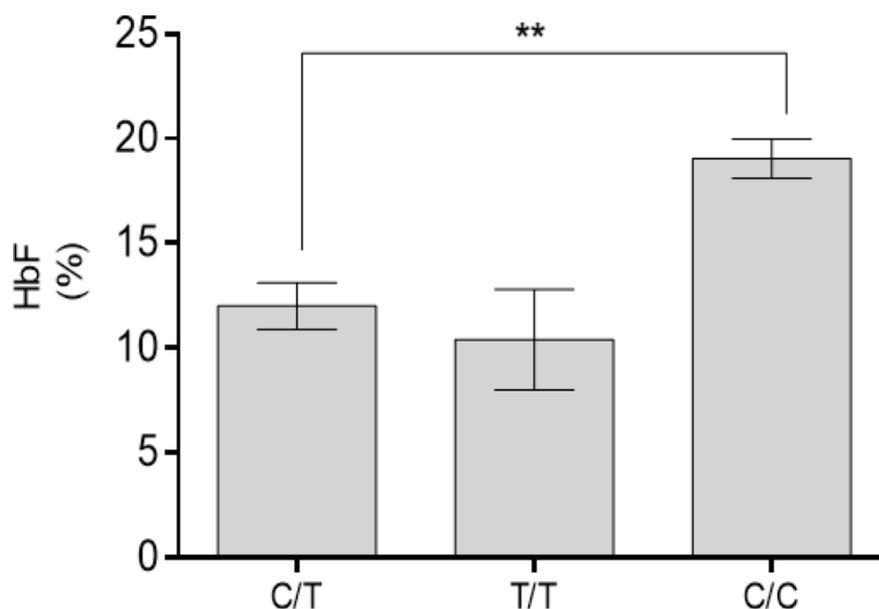
SNP rs12203592			
Parâmetro	Alelo T	Alelo C	P
HbF (%)	11,5± 0,87	19,2 ± 0,91	****<0,001
HbA2 (%)	3,37 ± 0,17	3,36 ± 0,06	0,944
HbS (%)	80,9 ± 1,36	79,2 ± 1,19	0,7510

Legenda: Alelo T: presença do polimorfismo no gene de IRF 4; Alelo C: ausência do polimorfismo no gene de IRF 4. Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Nota: *p<0,05. teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

4.10 Análise da influência do polimorfismo nos níveis de hemoglobina fetal nos pacientes com anemia falciforme que não fazem uso de hidroxiureia

A análise estatística foi novamente realizada excluindo os pacientes que faziam uso de hidroxiureia com a finalidade de determinar a HbF sem a interferência do uso desse fármaco, uma vez que a HU tem como ação principal elevar os níveis de HbF. Dessa maneira, notou-se que C/T ($12,0 \pm 1,11$ %) apresentou menores concentrações de hemoglobina fetal em comparação com C/C ($19,1 \pm 0,935$ %) (**p=0,001) (Figura 24).

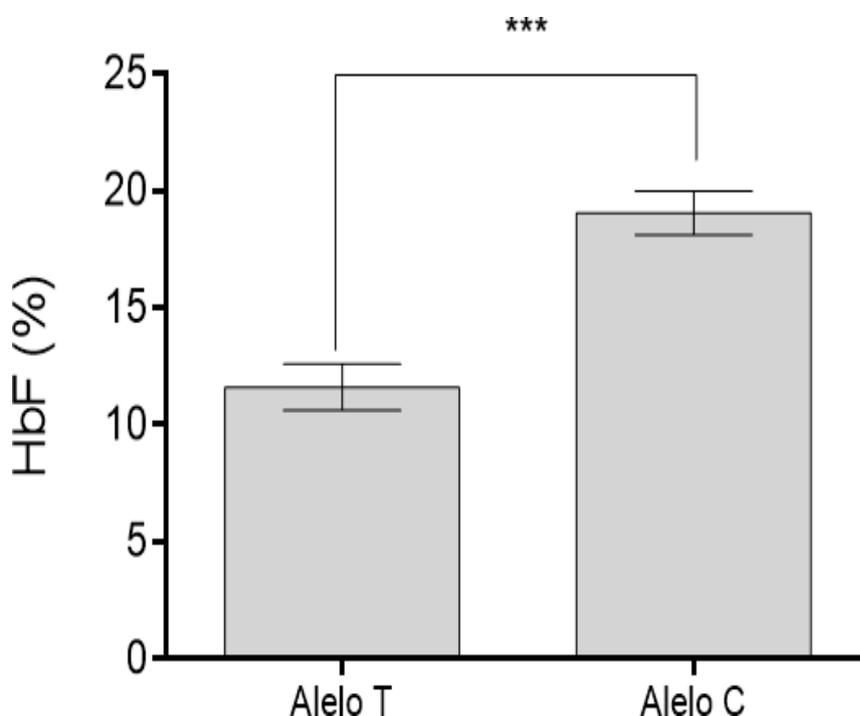
Figura 21 –Níveis de hemoglobina fetal de acordo com o genótipo nos pacientes que não fazem uso de hidroxiureia



Legenda: Genótipo heterozigoto polimórfico (C/T), Genótipo homozigoto polimórfico (T/T) e Genótipo selvagem (C/C), Hemoglobina fetal (HbF). Nota:**p=0,001, teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Avaliou-se também se o alelo T interferia nos níveis de HbF nos pacientes com anemia falciforme que não fazem uso de hidroxiureia. Diante disso, notou-se que o grupo contendo pacientes com alelo T ($11,6 \pm 0,99$ %) apresentou menores concentrações de hemoglobina fetal em comparação com o grupo contendo pacientes com alelo C ($19,1 \pm 0,935$ %) (Figura 25).

Figura 22 - Níveis de hemoglobina fetal de acordo com o alelo nos pacientes que não fazem uso de hidroxiureia

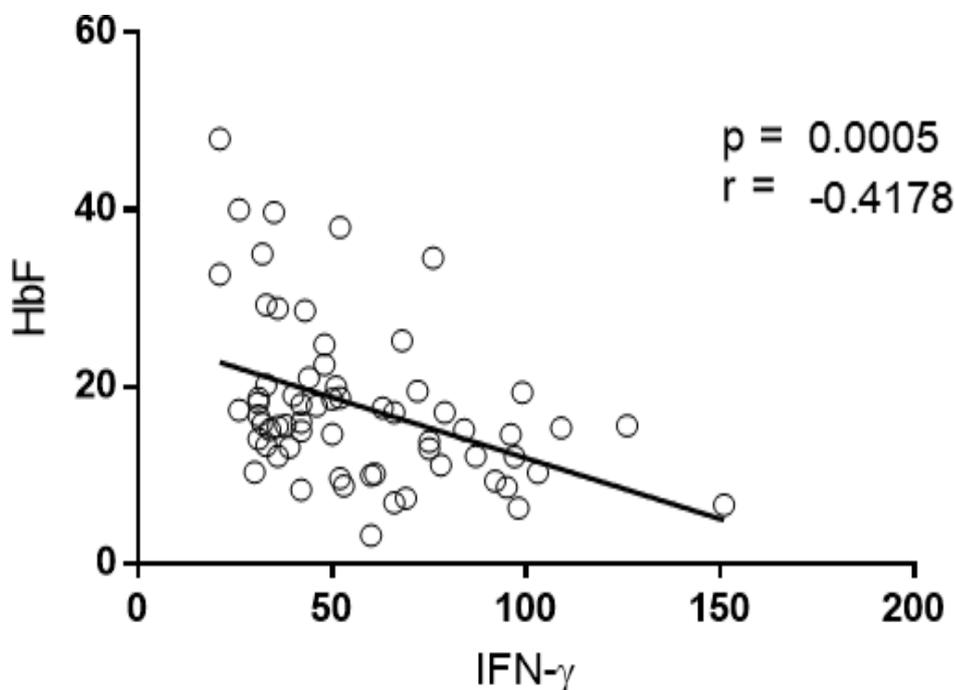


Legenda: Alelo T: presença do polimorfismo rs12203592; Alelo C: ausência do polimorfismo rs12203592; Hemoglobina Fetal (HbF). Nota: * $p < 0,005$, teste T não pareado.

4.11 Correlação dos níveis de hemoglobina fetal e interferon gama dos pacientes com anemia falciforme que não fazem uso de hidroxiureia (C/T, T/T e C/C)

Nesse contexto, considerando que os testes anteriores mostraram que os níveis de HbF e de IFN- γ sofreram influência do polimorfismo, decidiu-se verificar se estas variáveis apresentam relação linear. Com isso, obteve-se uma correlação negativa moderada ($r = -0,417$) entre essas duas variáveis, indicando que quanto menores os níveis séricos do IFN- γ maiores eram os de HbF (Figura 26).

Figura 23 - Correlação da hemoglobina fetal com os níveis séricos de interferon-gama nos pacientes que não fazem uso de hidroxiureia



Legenda: interferon-gama (IFN- γ), r (coeficiente de correlação). Nota= *** $p < 0,05$; teste de correlação de Pearson.

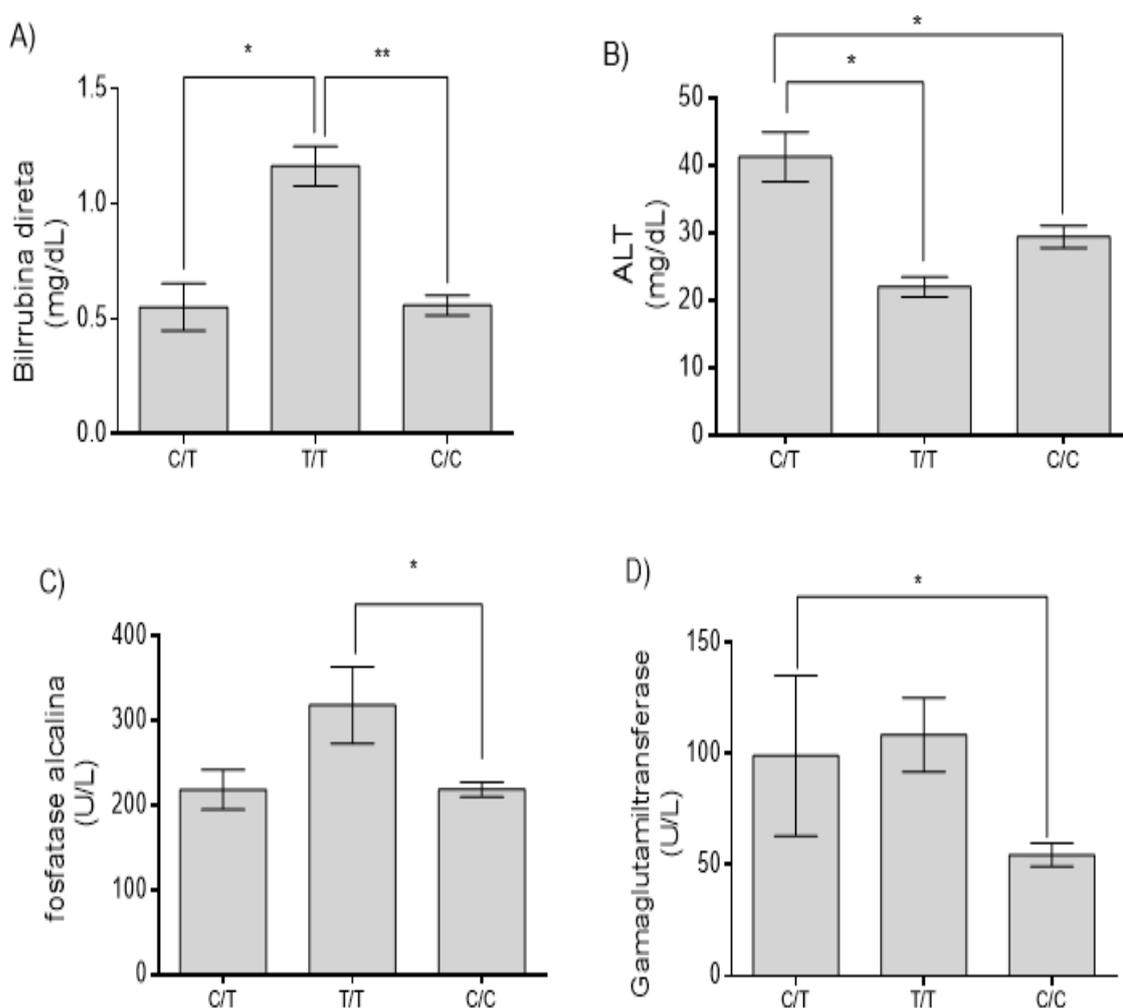
4.12 Análise da influência do genótipo nos parâmetros bioquímicos nos pacientes com anemia falciforme

Verificou-se também se o genótipo influencia nos parâmetros bioquímicos, visto que o grupo com genótipo polimorfo, sobretudo o grupo T/T, apresentou maiores concentrações de IFN- γ e menores de HbF. Dessa maneira, obteve-se diferença nos seguintes indicadores de lesões hepática: bilirrubina direta (** $p = 0,009$), ALT (* $p = 0,020$), fosfatase alcalina (* $p = 0,043$) e Gamaglutamiltransferase (* $p = 0,015$).

Os níveis plasmáticos de bilirrubina direta estão aumentados no grupo T/T ($1,16 \pm 0,085$ mg/dL) em relação a C/T ($0,550 \pm 0,102$ mg/dL) e C/C ($0,557 \pm 0,043$ mg/dL) (figura 27A). A enzima alanina transferase (ALT) apresentou maior atividade no grupo C/T ($41,3 \pm 3,69$ U/L) em comparação com T/T ($22,0 \pm 1,48$ U/L) e C/C ($29,4 \pm 1,63$ U/L) (figura 27B). Adicionalmente, a enzima Fosfatase Alcalina (FA) apresentou maior atividade no grupo T/T

($318 \pm 45,4$ U/L) em comparação com C/T ($218 \pm 23,5$ U/L) e C/C ($218 \pm 8,94$ U/L) (figura 27C). Por fim, o marcador hepático Gamaglutamiltransferase (GGT) apresentou uma maior atividade no grupo T/T ($108 \pm 16,7$ U/L) em relação ao grupo com genótipo C/T ($99,0 \pm 36,2$ U/L) e C/C ($54,4 \pm 5,16$ U/L) (figura 27D).

Figura 24 - Comparação dos parâmetros bioquímicos de acordo com o genótipo nos pacientes com anemia falciforme



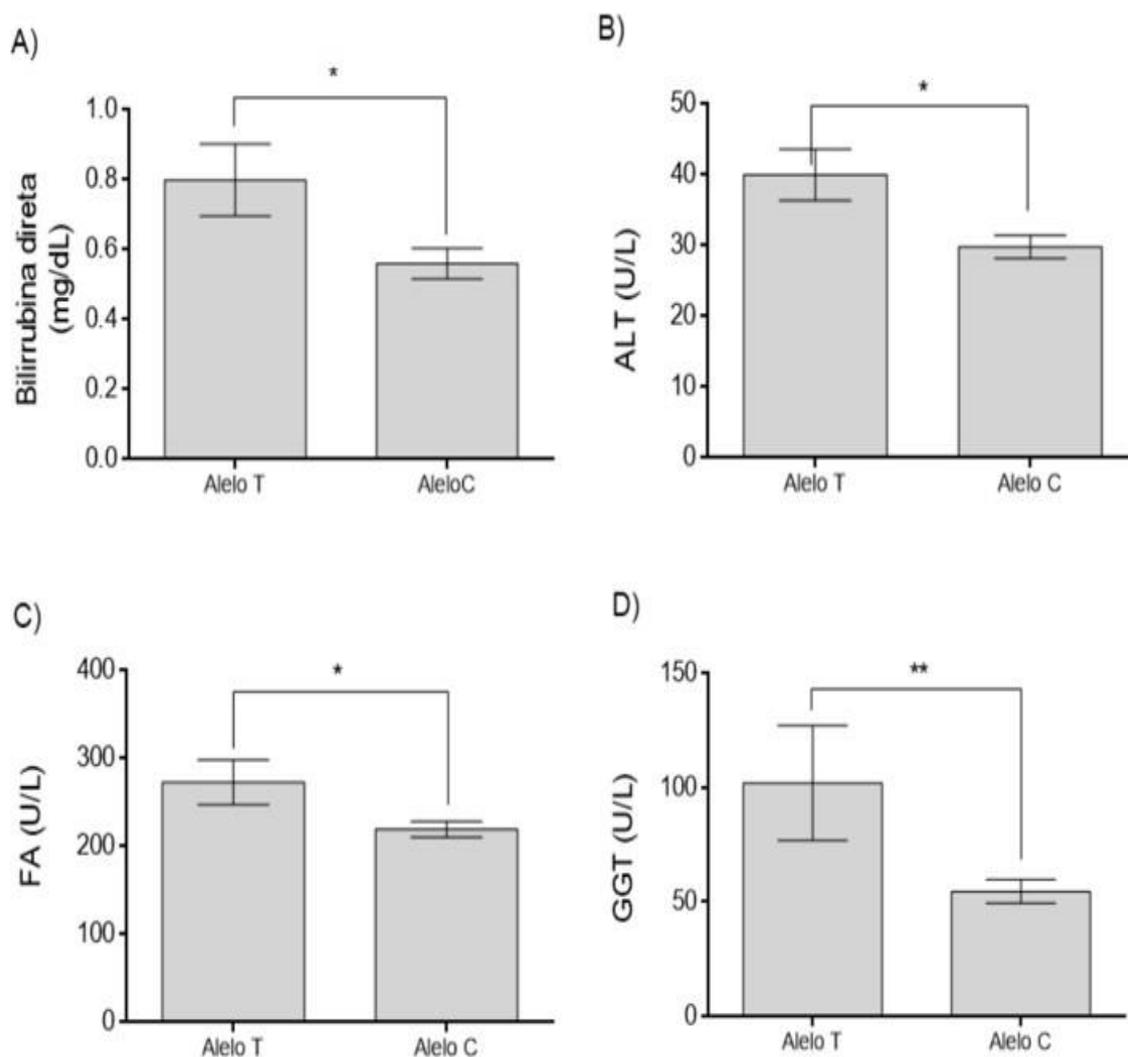
Legenda: Genótipo polimorfo heterozigoto (C/T), Genótipo polimorfo homozigoto (T/T), Genótipo selvagem (C/C); Alanina Transferase (ATL). Nota: * $p < 0,05$. Teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

4.13 Análise da influência dos alelos nos parâmetros bioquímicos nos pacientes com anemia falciforme

Verificou-se também que o alelo influencia nos parâmetros bioquímicos, obtendo diferença nos seguintes indicadores de lesões hepática: bilirrubina direta (** $p = 0,040$), ALT (* $p = 0,029$), fosfatase alcalina (* $p = 0,025$) e Gamaglutamiltransferase (* $p = 0,003$).

Os níveis plasmáticos de bilirrubina direta estão aumentados no grupo com alelo T ($0,79 \pm 0,103$ mg/dL) em relação a C ($0,557 \pm 0,043$ mg/dL) (figura 28A). A enzima alanina transferase (ALT) apresentou maior atividade no grupo T ($39,9 \pm 3,62$ U/L) em comparação com C ($29,4 \pm 1,63$ U/L) (figura 28B). Adicionalmente, a enzima Fosfatase Alcalina (FA) apresentou maior atividade no grupo T ($372 \pm 25,2$ U/L) em comparação com C ($218 \pm 8,94$ U/L) (figura 28C). Por fim, o marcador hepático Gamaglutamiltransferase (GGT) apresentou uma maior atividade no grupo T ($101 \pm 25,8$ U/L) em relação ao grupo com alelo C ($54,4 \pm 5,16$ U/L) (figura 28D).

Figura 25 - Comparação dos parâmetros bioquímicos de acordo com os alelos nos pacientes com anemia falciforme

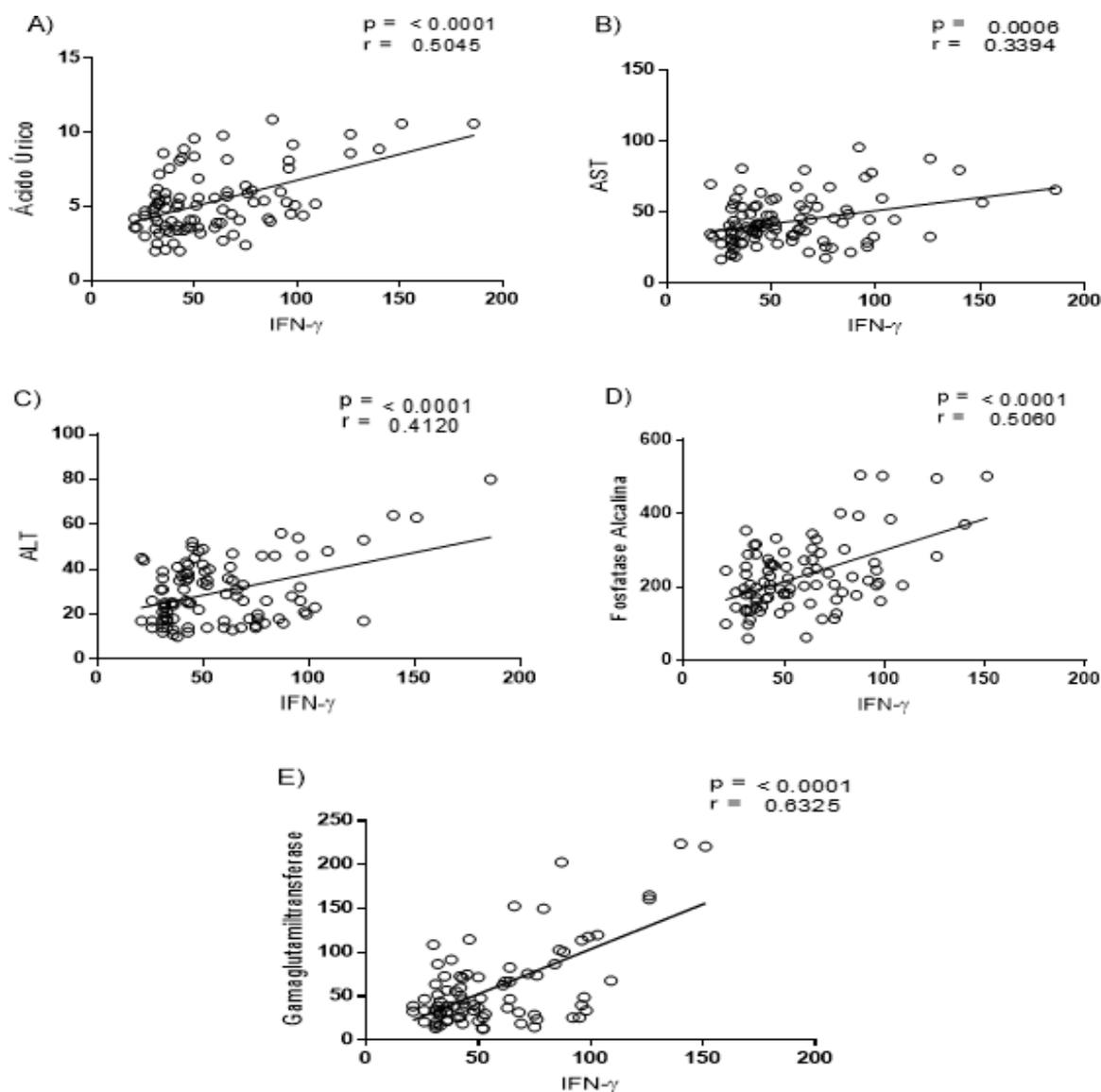


Legenda: Alelo T: presença do polimorfismo rs12203592; Alelo C: ausência do polimorfismo rs12203592; Hemoglobina Fetal (HbF). Nota: * $p < 0,005$, teste T não pareado.

4.14 Correlação entre interferon-gama e parâmetros bioquímicos nos pacientes com anemia falciforme (C/T, T/T e C/C)

Tendo como finalidade avaliar se os níveis séricos de IFN- γ estão associados com lesões hepáticas, realizou-se a correlação dos parâmetros bioquímicos com IFN- γ nos pacientes portadores de anemia falciforme. Diante disso, obteve-se uma correlação positiva moderada nos seguintes parâmetros: ácido úrico ($r=0,504$), AST ($r=0,339$), ALT ($r=0,412$), fosfatase alcalina ($r=0,506$) e GGT ($r=0,632$) (figura 29).

Figura 20 - Correlação entre interferon-gama e parâmetros bioquímicos nos pacientes com anemia falciforme

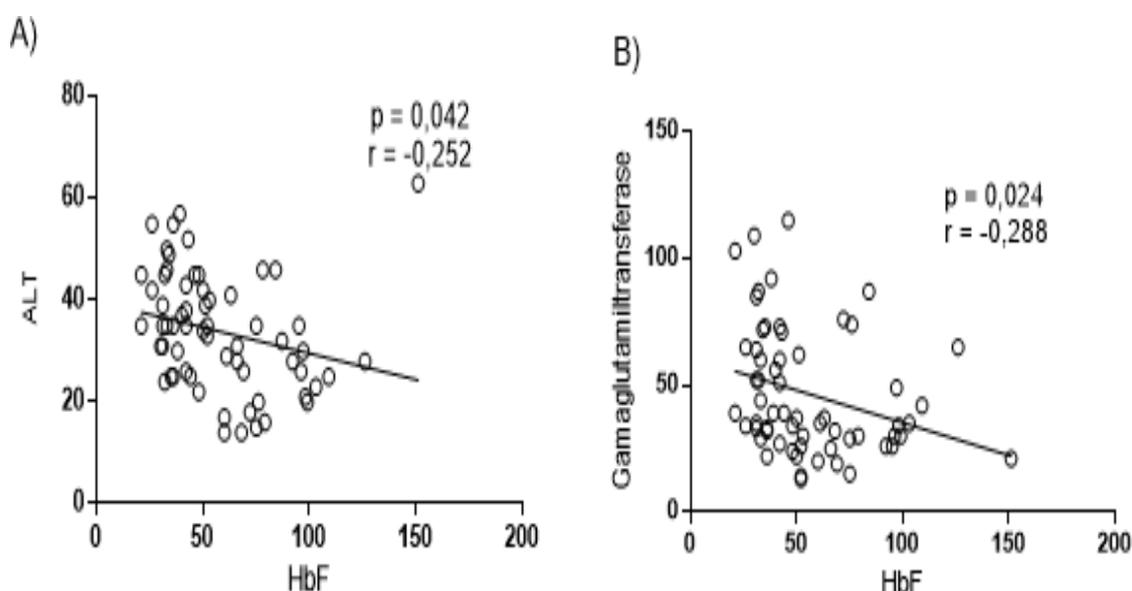


Legenda: Alanina Transferase (ALT), Aspartato transferase (AST), Interferon-gama (IFN- γ), r (coeficiente de correlação). Nota= * $p<0,05$; correlação de Pearson

4.15 Correlação de HbF com parâmetros bioquímicos nos pacientes que não usam HU

Tendo como finalidade verificar a capacidade protetora de HbF sobre os danos causados pela vaso-oclusão nos órgãos-alvo, verificou-se a relação de HbF com parâmetros bioquímicos em pacientes que não fazem uso de hidroxiureia. Diante disso, ALT ($r=-0,252$) e GGT ($r=-0,288$) apresentaram correlação negativa com a HbF (figura 30).

Figura 2621 - Correlação de HbF com parâmetros bioquímicos nos pacientes que não usam HU



Legenda: Alanina transferase (ALT), alanina transferase (ALT), Hemoglobina Fetal (HbF), r (coeficiente de correlação). Nota= * $p < 0,05$, Correlação de Pearson.

4.16 Influência do genótipo e do uso de hidroxiureia sobre os parâmetros bioquímicos

Sabe-se que o uso de hidroxiureia está associada com a redução de danos em órgãos-alvos, sendo a principal ferramenta farmacológica usada no tratamento da anemia falciforme. Dessa maneira, decidiu-se verificar os parâmetros bioquímicos quando se considera o uso ou não de HU e a presença do polimorfismo. Para isto, os indivíduos C/T e T/T foram dicotomizados como polimorfos e foi realizada uma análise multivariada através do Modelo Linear Geral.

Diante disso, verificou-se que os indicadores, ácido úrico (* $p=0,031$) e GGT (* $p=0,059$), sofreram influência do genótipo. Os pacientes com genótipos polimórficos (CT e TT) apresentaram níveis plasmáticos aumentados em comparação com o genótipo selvagem

(CC), indicando que o polimorfismo interfere nesses marcadores laboratoriais. Adicionalmente, a ureia (*p=0,030), a enzima lactato desidrogenase (*p=0,021) e a bilirrubina direta (*p=0,033) apresentaram valores mais altos nos indivíduos que não fazem uso de hidroxiureia em comparação aos que faziam, sugerindo que o tratamento medicamentoso com a hidroxiureia melhora o perfil hemolítico ao evitar a liberação da LDH presente no interior do eritrócito (tabela 6).

Tabela 6 - Parâmetros bioquímicos quanto ao uso de hidroxiureia e ao polimorfismo

	SNP rs12203592						
	C/C		C/T e T/T		p – Valor		
	USA HU	NÃO USA HU	USA HU	NÃO USA HU	Grupo	HU	Grupo × HU
Ur(mg/dL)	20,3±15,8	16,7±6,90	20,2±7,90	23,0±21,4	0,714	0,030*	0,743
Cr(mg/dL)	0,70±0,68	0,51±0,14	0,63±0,22	0,51±0,14	0,805	0,092	0,653
Au(mg/dL)	5,06±2,02	5,83±2,41	5,48±2,64	6,40±2,04	0,031*	0,100	0,174
LDH(U/L)	735±253	826±573	795±374	1033±440	0,257	0,021*	0,531
BT(mg/dL)	2,79±1,52	4,10±3,64	2,55±1,49	4,11±1,50	0,590	0,086	0,734
BD(mg/dL)	0,57±0,44	0,70±0,65	0,56±0,38	1,20±0,34	0,135	0,033*	0,229
BI(mg/dL)	2,22±1,35	3,39±3,57	1,99±1,44	2,90±1,62	0,830	0,160	0,781
ALT(U/L)	43,4±20,1	47,8±18,5	52,3±20,9	41,7±14,5	0,190	0,817	0,254
AST(U/L)	28,0±15,0	39,6±48,0	36,2±14,8	22,5±6,85	0,543	0,959	0,294
AST/ALT	1,75±0,81	1,72±0,83	1,70±1,04	2,01±0,89	0,143	0,778	0,333
FA(U/L)	220±80,8	237±95,4	242±97,5	276±92,1	0,270	0,365	0,755
GGT(U/L)	51,7±34,6	61,4±60,0	93,7±101	85,7±44,1	0,059*	0,961	0,611

Legenda: Genótipo heterozigoto polimórfico (C/T), Genótipo homozigoto polimórfico (T/T) e Genótipo selvagem (C/C); Ur: ureia, Cr: creatinina, Au: ácido úrico, LDH: Lactato desidrogenase, BT: bilirrubina total, BD: bilirrubina direta, BI: bilirrubina indireta, ALT: alanina transferase, AST: alanina transferase, AST/ALT: coeficiente de Rittis, FA: fosfatase alcalina, GGT: gamaglutamiltransferase. SNP: Polimorfismo de Nucleotídeo Único. Nota: *p<0.05, teste Modelo Linear Geral.

4.17 Análise da sensibilidade e especificidade de hemoglobina fetal e interferon-gama nos pacientes com anemia falciforme (C/T, T/T e C/C)

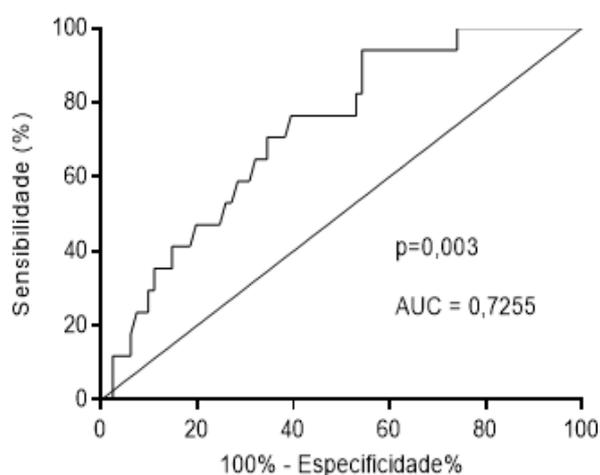
Percebeu-se que HbF e IFN- γ sofreram influência do genótipo, apresentando correlação negativa com os indicadores de hemólise e correlação positiva com os de lesões hepáticas respectivamente, assim realizou-se a curva ROC para avaliar a capacidade de

sensibilidade e especificidade desses marcadores como instrumento de prognóstico da AF.

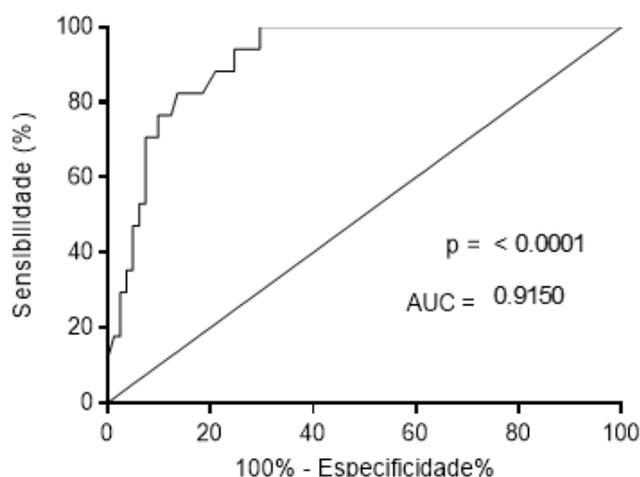
Para isto, os indivíduos foram dicotomizados entre selvagem (C/C) e polimórficos (C/T e T/T), obtendo 72,55% (AUC=0,7255; EP= 0,603; *p=0,003; 95% CI= 0,607 -0,843) e 91,50% (AUC=0,9150; EP= 0,029; *p=<0,0001; 95% CI= 0,857 - 0,972) de acurácia ao encontrar valores mais baixos de HbF e mais altos de IFN- γ em indivíduos polimorfos respectivamente (figura 31).

Figura 27 - Curvas de características de operação (ROC) para os níveis de hemoglobina fetal e de interferon-gama

A) Hemoglobina Fetal



B) Interferon-gama



Legenda: as curvas de características de operação (ROC) são uma forma de representar a relação entre a sensibilidade e a especificidade de um teste de diagnóstico quantitativo. Um teste ideal é aquele cuja área sobre a curva (AUC) é igual 1, ou seja, quanto mais próximo desse valor o teste apresenta maior sensibilidade e especificidade. A AUC de hemoglobina fetal e de interferon-gama é 0,7255 e 0,9150 respectivamente; *p<0,05.

4.18 Frequência de complicação clínica da anemia falciforme entre o grupo polimorfo e selvagem

Com o intuito de associar as alterações laboratoriais à danos em órgãos-alvos, os indivíduos dicotomizados como polimórficos (C/T e T/T) e selvagem (C/C) foram comparados quanto à frequência de ocorrência de disfunções orgânicas. Nesse sentido, o grupo polimórfico apresentou uma maior frequência de hepatomegalia ($p=0,004^*$), nefropatia falciforme ($p=0,015^*$) e crise vaso-oclusiva ($p=<0,0001^*$) do que o grupo selvagem, sugerindo que o grupo polimorfo é mais suscetível a complicação da anemia falciforme (tabela 7).

Tabela 7- Frequência de complicação da anemia falciforme entre o grupo polimorfo e selvagem

Genótipo	Com complicação		Sem complicação		p
	C/T e T/T	C/C	C/T e T/T	C/C	
Hepatite	3 (3,06%)	13 (13,2%)	13 (13,2%)	64 (65,3%)	0,771
Colelitíase	7 (7,14%)	42 (42,8%)	9 (9,1%)	34 (34,6%)	0,402
Hepatomegalia	12 (12,2%)	27 (27,5%)	4 (4,0%)	49 (50,0%)	0,004*
Pneumonia	9 (9,18%)	49 (50,0%)	7 (7,14%)	26 (53,0)	0,709
Dispneia	9 (9,18%)	29 (29,5%)	7 (7,14%)	47 (47,9%)	0,182
Doença cardíaca	8 (8,16%)	32 (32,6%)	8 (8,16%)	44 (44,8 %)	0,563
STA	5 (5,10%)	23 (23,4%)	11 (11,2%)	53 (54,0%)	0,938
Nefropatia falciforme	10 (10,2%)	23(23,4 %)	6 (6,12%)	53 (54,0%)	0,015*
Necrose óssea	3 (3,06%)	15(25,3 %)	13 (13,3%)	61 (62,2%)	0,928
Crise vaso-oclusiva	10 (10,2%)	10 (10,2%)	6 (6,12%)	66 (67,3%)	<0,001*
Úlcera de membros	3 (3,06%)	24 (24,4%)	13 (13,2%)	52 (53,0%)	0,306

Legenda: Genótipo polimorfo heterozigoto (C/T), Genótipo polimorfo homozigoto (T/T) e Genótipo selvagem (C/C); STA= síndrome torácica aguda. Nota: * $p<0,05$, teste do qui-quadrado.

4.19 Razão de chances dos pacientes sem polimorfismo e com valores mais altos de hemoglobina fetal desenvolverem complicações da anemia falciforme

Considerando que o grupo selvagem apresentou maiores concentração de HbF e que os testes anteriores realizados mostram que essa hemoglobina apresentou correlação negativa com marcadores de lesões de hemólise e de danos hepáticos e renais, verificou-se a

presença do polimorfismo está associada com complicações da anemia falciforme. Nesse sentido, estimou-se que indivíduos sem polimorfismo e com valores mais altos de HbF têm apenas 15,3%, 30,90%, 27,20% e 16,60% de chances de desenvolverem, respectivamente, hepatite, síndrome torácica aguda, necrose óssea e úlcera de membros em comparação com os que têm polimorfismo e HbF mais baixa (tabela 8).

Tabela 8 - Razão de chances dos pacientes sem polimorfismo e com maiores níveis de hemoglobina fetal desenvolverem complicações da anemia falciforme

N=98	P	Odds Ratio
Hepatite	0,017*	0,153
Colelitíase	0,285	0,511
Hepatomegalia	0,201	2,395
Pneumonia	0,361	1,771
Dispneia	0,541	1,466
Doença cardíaca	0,958	1,033
Síndrome torácica aguda	0,048*	0,309
Nefropatia falciforme	0,892	1,091
Necrose óssea	0,046*	0,272
Crise vaso-oclusiva	0,457	1,714
Úlcera de membros	0,017*	0,166

Legenda: odds ratio= razão de chances. Nota: *p<0,05, teste regressão logística binária.

5 DISCUSSÃO

A anemia falciforme é um distúrbio autossômico recessivo hereditário que não está ligada ao gênero, acometendo tantos indivíduos do sexo feminino quanto masculino (INUSA *et al.*, 2019). No entanto, no presente estudo, observou-se que a maioria dos participantes do estudo eram do sexo feminino. Esse achado corrobora com os estudos de Santos *et al.*, (2021), os quais avaliaram 668 casos de DF no estado do Ceará no período de 1964 a 2018, encontrando uma maior prevalência de anemia falciforme no sexo feminino.

A idade média dos participantes da pesquisa era de 32 anos e o tempo de diagnóstico médio era de 23 anos, variando de 2 a 49 anos. A expectativa de vida de uma pessoa vivendo com AF é de 43 anos nos Estados Unidos em comparação com a população em geral que é de 78 anos (BRANDOW; LIEM, 2022). Entretanto, o diagnóstico precoce da AF, preferencialmente na primeira semana de vida, aumenta a sobrevida desse público (PAIVA *et al.*, 2022). Programas de triagens neonatais são de extrema importância na detecção de doenças hematológicas. No Brasil, desde 2001, é realizado o “teste do pezinho” em recém-nascidos com a finalidade de identificar precocemente hemoglobinopatias, reduzindo a mortalidade dessa doença ao garantir acesso ao tratamento nos primeiros anos de vida (MARTINS *et al.*, 2022).

A principal terapia medicamentosa utilizada no tratamento da AF é a hidroxiureia. Ela é decisiva no aumento da longevidade dos portadores de AF. O mecanismo de ação desse fármaco na AF não é totalmente compreendido, mas sabe-se que ela atua inibindo a enzima ribonucleotídeo redutase, bloqueando a síntese de DNA. Além disso, a HU promove o aumento dos níveis de HbF, bem como reduz o número de linfócitos circulantes e de moléculas de adesão, predominando um equilíbrio entre os fenômenos pró e anti-inflamatórios (SALES *et al.*, 2022). No presente estudo, 65 pacientes faziam uso de HU, entretanto nem todos possuíam os requisitos clínicos necessários para o uso desse fármaco.

A maior parte dos pacientes com AF que participaram do estudo residiam no interior do estado e faziam o tratamento no HEMOCE. Dessa forma, considerando que esse centro de referência em hemoglobinopatias se encontra localizado na cidade de Fortaleza e que os custos com deslocamento entre as cidades são altos, os pacientes, sobretudo os de classe social mais baixa, apresentavam dificuldades econômicas e sociais para obterem acesso ao tratamento. Nesse sentido, Souza (2021) apontou que as condições domiciliares e a renda são as principais causas de baixa na busca por atendimento médico por pessoas que convivem com AF, sendo fator determinante no agravamento dos sintomas.

Observou-se também que a maior parte da população estudada apresentava o

genótipo selvagem (C/C) e o alelo C. Esse achado corrobora com os resultados obtidos no *Project 1000 genome*, onde identificou uma maior frequência do alelo T na população europeia, enquanto a população africana e latino-americana apresentava uma maior frequência do alelo C (National Library of Medicine, 2023). Ademais, observou-se também que as frequências genotípica e alélica não se encontram em equilíbrio com o princípio de Hardy-Weinberg, indicando que os fatores evolutivos, como migração e seleção natural, atuam na frequência do polimorfismo na população avaliada.

Além disso, o grupo controle e o com anemia falciformes apresentavam o mesmo perfil quanto ao genótipo, indicando que a presença do polimorfismo rs12203592 não está vinculado a AF, abrangendo ambos os grupos. Em adição, Ward *et al.*, (2020) identificaram que esse polimorfismo está associado a um risco aumentando de desenvolvimento de doenças oncohematológicas, indicando que a presença do alelo T contribui com o desenvolvimento de alterações biológicas.

A vaso-occlusão é o principal mecanismo envolvido no desenvolvimento dos sintomas da AF. Os drepanócitos, quando presente na circulação, interagem com células endoteliais, recrutando células do sistema imune e fatores de coagulação para o local. Isso resulta em obstrução do fluxo sanguíneo, promovendo isquemia seguida de vasodilatação que causa lesão por isquemia-reperfusão em múltiplos órgãos (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

Em consequência a esse processo, é evidenciado nos portadores de anemia falciforme inflamação generalizada. Em um microambiente de tecido inflamado, as citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas (IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21), ligam-se a seus receptores presentes nas células T e NK, levando a ativação de elementos de transcrição, sobretudo o transdutor de sinal e ativador da transcrição 4 (STAT4), que promovem a produção de IFN- γ (JORGOVANOVIC *et al.*, 2020).

O fator regulador de interferon 4 induz a diferenciação de células T no subconjunto Th1. Essa célula junto com células *natural killer* (NK) quando estimuladas são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ . Essas moléculas pró-inflamatórias apresentam papel fundamental na defesa do organismo contra infecção por microrganismo (THOMASON *et al.*, 2020). Yang *et al.*, (2015) identificaram que a inibição de IRF4 está associado com menor diferenciação de células T ao seu perfil inflamatório (Th1) em indivíduos com encefalomielite autoimune, bem como menores concentrações de IFN- γ . Eles concluíram que a inibição desse fator de transcrição melhora o perfil inflamatório do paciente, visto que em doenças inflamatórias ocorre um excesso de produção de citocinas pró-inflamatórias.

O IFN- γ é a principal citocina associada aos processos inflamatórios. Dentre suas funções, ele age induzindo a ativação endotelial, levando a produção de quimiocinas que recrutam macrófagos para o local inflamado, aumenta a atividade de NK e induz a diferenciação de células B em células plasmáticas (MERLI *et al.*, 2021). Portanto, IFN- γ tem papel fundamental no desenvolvimento de doença inflamatórias, uma vez que ele regula positivamente a cascata de citocinas responsáveis pela inflamação (LANARO *et al.*, 2008).

No presente estudo, encontrou-se maiores níveis séricos de IFN- γ nos pacientes com anemia falciforme em comparação ao grupo controle. Dentre os pacientes com anemia falciforme, notou-se que o genótipo e o alelo influenciam nos níveis plasmáticos de IFN- γ , uma vez que o grupo com genótipo polimórfico e o grupo com alelo T apresentaram maiores níveis de IFN- γ . Laurentino *et al.*, (2014) e Cavalcante *et al.*, (2016) observaram que os níveis de citocina pró-inflamatória variam de acordo com o polimorfismo genético de cada paciente e com o uso de hidroxiureia. Eles encontraram maiores níveis de TNF- α em pacientes com AF em comparação ao controle. TNF- α e IFN- γ são importantes moléculas pró-inflamatórias que quando aumentadas indicam um processo inflamatório persistente, causando danos teciduais e lesões em múltiplos órgãos.

Em quadro graves de anemia falciforme, é observado redução da concentração de hemoglobina e aumento dos níveis de reticulócitos. A medula óssea libera para a circulação sanguínea células da linhagem vermelha mais jovens para recompensar a hemólise e a destruição de células falciformes no baço. Além disso, os drepanócitos possuem meia-vida menor quando comparados a hemácia normal com formato bicôncavo, fazendo com que a produção de eritrócitos pela medula óssea esteja sobrecarregada (KHALED *et al.*, 2020).

Nessa perspectiva, nos indivíduos portadores de anemia falciforme com genótipo polimórfico, notou-se menores concentrações de hemoglobina total e maiores números absolutos e relativos de reticulócitos. Em adição, o grupo contendo indivíduos com alelo T apresentaram maiores concentrações de reticulócitos absoluto. Tais achados indicam que esses pacientes podem apresentar maior hemólise dos drepanócitos e liberação de células jovens da medula óssea para circulação. Os drepanócitos apresentam maior facilidade de ruptura da membrana plasmática, uma vez que eles apresentam uma maior rigidez celular quando comparados a eritrócitos normais com formato bicôncavo (MANDAL; MITRA; DAS, 2020).

Verificou-se também que o genótipo e o alelo intervêm na concentração das variantes de hemoglobina. Os grupos contendo indivíduos com genótipo selvagem e com alelo C apresentaram maiores concentrações de HbF em comparação com os grupos contendo indivíduos polimórficos e com alelo T. A formação de um composto híbrido formado pelas

cadeias de HbS e HbF inibe a polimerização de HbS, evitando a formação de novos drepanócitos (STEINBERG, 2020). Logo, esse achado sugere que esses indivíduos podem apresentar quadro clínico mais brando, como redução da frequência dos sintomas, uma vez que a vaso-oclusão é impedida.

A predominância de HbF em comparação com HbS indica que ocorre uma diminuição da produção de células falciformes e, conseqüentemente, redução da inflamação promovida pelo processo de vaso-oclusão. As lesões por isquemia-reperusão e por moléculas produzidas pelo estresse oxidativo são fatores determinantes no desenvolvimento de complicações graves da AF, logo o uso de fármacos, como a hidroxureia, que atuam evitando esses processos biológicos é essencial na estabilização da doença (DALTRO *et al.*, 2020).

O uso da hidroxureia é indicado como medida preventiva das implicações clínicas da AF, uma vez que esse fármaco tem como efeito principal elevar os níveis de HbF. Entretanto, nem todos os portadores de AF são indicados a iniciarem o tratamento com HU, sendo necessários que o paciente atenda aos requisitos clínicos e laboratoriais necessários para serem incluídos no protocolo de tratamento. Além disso, alguns pacientes recusam o tratamento devidos aos efeitos colaterais relacionados ao uso de HU (CANÇADO *et al.*, 2009).

Ao analisar os pacientes que não fazem uso de HU, o grupo com genótipo selvagem e com alelo C foram os que apresentaram maiores concentração de HbF. Isso sugere que os pacientes que não apresentam o polimorfismo no gene de IRF4 são menos propensos a desenvolverem complicações grave da AF, como osteonecrose, síndrome torácica aguda e crises vaso-oclusivas.

Ao correlacionar os achados laboratoriais dos pacientes portadores de anemia falciforme que não fazem uso de hidroxureia, notou-se que os níveis séricos de HbF e IFN- γ apresentaram correlação negativa moderada, ou seja, quando um aumenta o outro diminui. Isso acontece devido as características distintas que os dois parâmetros apresentam no curso da doença (OKONGWU *et al.*, 2019).

HbF age, principalmente, inibindo a polimerização da desoxi-HbS, evitando a formação de células falciformes (HASHEMI; EBRAHIMZADEH, 2022). Por outro lado, IFN- γ exerce ações pró-inflamatórias que favorecem o processo vaso-oclusivo, como induzir a ativação endotelial que leva a uma maior expressão de moléculas de adesão, como P e E-selectinas, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão de células vascular 1 (VCAM-1) (DE *et al.*, 2022).

Em adição, IFN- γ inibe também o crescimento de células progenitoras da medula óssea e reduz a síntese da cadeia gama da globina que compõe HbF (LÓPEZ-GARCÍA;

CASTRO-MANRREZA, 2021). Nesse sentido, acredita-se que a inibição de IRF4 está associado com a redução dos níveis de IFN- γ e de células Th1 (RODENKIRCHEN; SCHETTGEN; RINK, 2020). Logo, o aumento da expressão desse fator de transcrição nos linfócitos favorece a produção de citocinas inflamatórias, as quais interferem indiretamente nos níveis de HbF.

As manifestações clínicas da AF são bastante heterogêneas. Os pacientes podem apresentar-se desde assintomáticos até formas incapacitantes. Diversos fatores interfere na gravidade clínica na AF, incluindo níveis de HbF, associação com α -talassemia, haplótipos de β -globina e presença de polimorfismos de nucleotídeo único (ELLIOT *et al.*, 2007). A vaso-occlusão promove lesões por isquemia-reperfusão em múltiplos órgãos, causando fibrose e atrofia seguida de infarto. O fígado e o rim podem apresentar redução da sua capacidade funcional e, nos casos mais graves, ser necessário o transplante (OGU *et al.*, 2021).

As alterações hepáticas são responsáveis por 7% das mortes por doença falciforme (KYRANA *et al.*, 2020) e acredita-se que entre 10 a 40% desses indivíduos apresentam disfunções hepatobiliares. As crises vaso-oclusivas na vasculatura do fígado, as múltiplas transfusões sanguíneas e a formação de cálculos biliares são as causas mais comum de alterações hepáticas, as quais comprometem significativamente a qualidade de vida desse público (CHAGAS; FRIGGI, 2022).

Em relação aos indicadores hepáticos investigados, notou-se que o grupo com genótipo polimórfico e com alelo T apresentaram maiores níveis séricos de ALT e de bilirrubina direta, bem como maior atividade de GGT e de fosfatase alcalina. Esse achado sugere que tais indivíduos podem apresentar uma maior predição ao desenvolvimento de hepatopatia falciforme em relação à indivíduos com genótipo selvagem.

Os pesquisadores Potrony *et al.*, (2017) identificaram que o alelo T está associado com maior expressão de IRF4 em linfócitos e Boddicker *et al.*, (2015) revelaram que a expressão de IRF4 é impulsionado pelo fator de transcrição NF- κ B e pela expressão de CD30 em pacientes com linfoma periférico de células T (PTCL). Por conseguinte, a regulação positiva de NF- κ B leva à regulação de genes envolvidos com a inflamação, como a produção de citocinas inflamatórias e a diferenciação de células T para seus perfis efetores.

Adicionalmente, verificou-se também que tais indicadores apresentaram correlação linear com os níveis plasmáticos de IFN- γ . Sabe-se que essa glicoproteína apresenta níveis aumentados em processos inflamatórios (TCHOPBA *et al.*, 2021), logo a inflamação característica dessa doença, originada do processo de vaso-occlusão, estimula a produção de citocinas inflamatórias que estão associados com danos nos hepatócitos.

Ye *et al.*, (2020) apontam que IFN- γ induz a polarização de macrófagos hepáticos ao perfil inflamatório (M1). Os macrófagos M1 exercem efeitos pró-inflamatórios, liberando citocinas inflamatórias e quimiocinas que recrutam outros tipos de células imunes para a vasculatura hepática, promovendo danos nos hepatócitos em decorrência dos repetidos ciclos de isquemia-reperusão.

Nos pacientes que não faziam uso de hidroxiureia, observou-se uma correlação negativa de HbF com ALT e GGT, indicando que os indivíduos com níveis elevados de HbF apresentavam menores lesões hepáticas. HbF apresenta propriedades protetora na anemia falciforme, uma vez que ela inibe a polimerização da HbS e, conseqüentemente, o processo vaso-oclusivo. Logo, espera-se que os portadores de anemia falciforme que possuem maiores níveis de HbF apresentem redução da frequência dos sintomas clínicos (KHANDROS; BLOBEL, 2021).

Percebeu-se que o genótipo e o uso de hidroxiureia influenciam nos parâmetros bioquímicos. Nessa perspectiva, os indicadores, ácido úrico e GGT, apresentaram níveis plasmáticos aumentados nos genótipos polimórficos em comparação com o genótipo selvagem, indicando que esses indivíduos são mais propensos a desenvolverem danos hepáticos.

Kambale-Kombi *et al.*, (2022) observaram que os pacientes com doença falciforme que apresentavam hiperuricemia possuíam diminuição da taxa de filtração glomerular, sendo fator de risco ao desenvolvimento de doença renal crônica. Ademais, Bortolotti *et al.*, (2020) identificaram que valores aumentados de GGT associados a ultrassonografia hepática anormal e rigidez são marcadores potencialmente precoces de hepatopatia falciforme. Portanto, no presente estudo, sugere-se que o polimorfismo está envolvido com o aumento desses marcadores bioquímicos resultantes de danos nesses órgãos gerados pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias que favorece o processo de vaso-oclusão.

Em adição, verificou-se também que os pacientes que faziam uso de hidroxiureia apresentaram menor risco de desenvolverem lesões hepática e renais, uma vez que tiveram menores níveis séricos de ureia, LHD e bilirrubina direta. Esses achados reforçam os estudos de Yahouédéhou *et al.*, (2019), os quais avaliaram que os indivíduos que faziam uso de hidroxiureia apresentavam reduções significativas desses biomarcadores, sugerindo que esse fármaco melhora os perfis hemolíticos e inflamatórios dos indivíduos estudados.

A lesão por isquemia-reperusão (IRI) proporcionada pela vaso-oclusão desencadeia uma cascata inflamatória que gera danos em múltiplos órgãos (DARBARI; SHEEHAN; BALLAS, 2020). Na pesquisa, notou-se que o grupo com genótipo C/C apresentou menores frequências de hepatomegalias, nefropatia falciforme e crises vaso-oclusivas do que

os indivíduos com genótipo T/T e C/T, indicando que o polimorfismo de IRF4 favorece o desenvolvimento desses processos biológicos.

A hepatomegalia é uma condição em que é observado um aumento significativo do tamanho do fígado. Essa condição pode levar à falência desse órgão quando não tratada. A obstrução do fluxo sanguíneo pelo processo de vaso-oclusão promove estase venosa e redução da concentração de oxigênio na vasculatura hepática, causando retenção de eritrócito no fígado (PRAHARAJ; ANAND, 2021).

O rim também é acometido na AF. As complicações renais têm origem na obstrução da vasa recta, que são capilares peritubulares especializados que se estendem do interior da medula renal e cursam paralelamente à alça de Henle. A medula renal apresenta condições ideais para a polimerização da HbS, como baixa concentração parcial de oxigênio, acidose e alta osmolaridade (AMARAPURKAR *et al.*, 2022).

Sasaki *et al.*, (2021) identificaram que a deleção de IRF4 em células mieloides protegeu contra o desenvolvimento de fibrose tubulointersticial após lesão renal isquêmica grave, sugerindo que a inflamação característica da AF seria reduzida por meio da inibição do recrutamento de monócito M1 e polarização para o perfil M2 que está relacionado com o reparo tecidual.

As crises vaso-oclusivas (CVO) são as complicações mais comuns da AF, sendo responsáveis por cerca de 90% das hospitalizações de adultos. São extremamente dolorosas com duração de dias a semanas. Elas acontecem em decorrência da isquemia tissular resultante da obstrução do fluxo sanguíneo pelos drepanócitos, comprometendo significativamente a qualidade de vida de seus portadores (COOPER *et al.*, 2019).

Lee *et al.*, (2019) revelaram que os camundongos com depleção de IRF4 apresentaram números reduzidos de neutrófilos e macrófagos circulantes, indicando que esse fator de transcrição apresenta papel fundamental na regulação das respostas imunes. Em adição, Darbari, Sheehan e Ballas (2020) destacaram que os indivíduos com baixos níveis de HbF apresentam maiores riscos de desenvolverem crises vaso-oclusivas, uma vez que a polimerização da HbS não é inibida por HbF.

Sabe-se também que o processo de vaso-oclusão está envolvido com o desenvolvimento de outras manifestações graves da AF. A hepatite crônica, a necrose óssea e a úlcera de membros são complicações que podem se estender por cerca de meses ou perdurar por toda a vida, enquanto a síndrome torácica aguda tem início súbito e deve ser reconhecida e tratada rapidamente a fim de evitar o óbito (BECK *et al.*, 2022).

Acredita-se que de 25 a 30% dos portadores de anemia falciforme têm doença

hepática crônica resultante de hepatite viral e da sobrecarga de ferro devido à múltiplas transfusões de concentrado de hemácias. A Hepatite é uma complicação grave da AF. Ela é caracterizada por ser uma inflamação do fígado que, em estado mais grave, pode levar à falência desse órgão. Infecção viral e intoxicação por medicamento são as principais causas dessa condição, no entanto processos inflamatórios, como a vaso-oclusão, podem levar a essa doença (THEOCHARIDOU; SUDDLE, 2019).

Estimou-se que os indivíduos sem polimorfismo e com valores mais altos de HbF têm apenas 15,3%, de chance de desenvolverem hepatite. A HbF constitui como um dos principais fatores moduladores do curso da doença, sendo utilizada como fator preventivo de complicações graves da AF. Ela age formando um híbrido entre as cadeias de HbF e HbS, fazendo com que elas não sejam incorporadas ao polímero de HbS, evitando a polimerização da HbS e o processo inflamatório no vaso sanguíneo (ALLARD *et al.*, 2022).

Chhabra *et al.*, (2017) apontam que o alelo T está envolvido com a superexpressão de IRF4 em células supressoras derivadas da linhagem mieloides. Elas apresentam a capacidade inibitória dos linfócitos T CD8⁺ reduzidas, favorecendo a proliferação dessas células e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ . Isso sugere que o polimorfismo colabora com o desenvolvimento de alterações hepáticas, regulando genes envolvidos com a inflamação.

A síndrome torácica aguda (STA) é uma complicação aguda da AF. É uma das principais causas de morte de adultos. Os eventos vaso-oclusivos na vasculatura pulmonar promovem danos nos pulmões. Os pacientes apresentam sintomas respiratórios (tosse, falta de ar, dor no peito, febre) associado a um novo infiltrado pulmonar presente na radiografia de tórax (CHEMINET *et al.*, 2022).

No estudo, estimou-se 30,90% de chance dos indivíduos sem polimorfismo e com valores mais altos de HbF desenvolverem STA. Nesse sentido, Alkindi *et al.* (2020) relataram que níveis séricos de hemoglobina fetal menores que 5% estão associados com o desenvolvimento dessa condição, visto que a HbF tem a capacidade de evitar o processo vaso-oclusivo ao evitar a polimerização da HbS.

O alelo T regula positivamente NF- κ B (SÁNCHEZ-MALDONADO *et al.*, 2020), levando a produção de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão endotelial que favorece os processos inflamatórios. Nesse sentido, considerando que esses fatores de transcrição regulam positivamente genes associado a inflamação, o genótipo influencia no desenvolvimento de STA, visto que o processo de vaso-oclusão é favorecido em ambientes inflamatórios.

A necrose óssea é outra manifestação clínica observada em pacientes com anemia

falciforme. Ela tem como causa principal a insuficiência circulatória crônica que induz danos à matriz óssea, gerando infarto seguida de isquemia em articulações e epífises de ossos longos. A cabeça do fêmur, seguida da cabeça do úmero e joelho são as regiões anatômicas mais comprometidas nessa condição (ADESINA; NEUMAYR, 2019).

Na pesquisa, estimou-se que 27,20% de chance dos indivíduos sem polimorfismo e com valores mais altos de HbF desenvolverem essa complicação. Kos *et al.*, (2018) concluíram que níveis elevados de HbF estão envolvidos com a maior diferenciação óssea dos osteoblastos em relação aos osteoclastos, além da diminuição da liberação de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6 e TGF-beta. Os osteoblastos, que são células jovens responsáveis pela produção da parte orgânica da matriz óssea, apresentam papel fundamental na mineralização da matriz óssea ao evitar o enfraquecimento da estrutura óssea que acontece nessa condição, apresentando propriedades benéficas contra a necrose óssea.

Zhang *et al.*, (2022) descobriram que IRF4 foi regulado negativamente durante a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais da medula óssea (BM-MSCs) e a superexpressão de IRF4 diminuir a diferenciação osteogênica para osteoblasto, promovendo a redução da mineralização da matriz óssea. Isso favorece um excesso de osteoclasto em comparação aos osteoblastos, resultando na diminuição da massa óssea que favorece o desenvolvimento de necrose óssea.

As úlceras de membros inferiores são complicações crônica da AF extremamente dolorosas e muitas vezes incapacitantes, as quais comprometem a qualidade de vida de seus portadores. As principais causas dessa manifestação são a hipóxia tissular resultante do processo vaso-oclusivo associado ao traumatismo e a infecção por microrganismos resistentes (GRANJA *et al.*, 2020). Nesse sentido, notou-se que os indivíduos com genótipo selvagem e com valores mais altos de HbF apresentaram menores chances de desenvolverem úlceras de membros em comparação com os indivíduos com genótipo polimorfo e com menores níveis de HbF.

Demirci *et al.*, (2020) apontam que HbF apresenta propriedades protetoras nas complicações da AF, uma vez que ela evita o início do processo de vaso-oclusão que é vital ao surgimento dessa condição. Em adição, Monfort e Senet (2020) pontuam que pacientes com concentrações mais alta de HbF apresentam menores frequência de úlceras de membros inferiores, recomendando o uso de fármacos que estimulam a produção dessa hemoglobina como estratégia profilática.

O alelo T está envolvido com uma maior capacidade de suprimir as células T efetoras pelas células Treg (KICHAEV *et al.*, 2018), inibindo-as respostas imunes. Com isso,

infecções oportunistas contribuem com a progressão das úlceras de membros, deixando-as menos responsivas ao tratamento.

Por fim, sabendo que os indivíduos selvagens tenderam a apresentar resultados mais promissores nos exames bioquímicos e que, muitas vezes, os testes de biologia molecular podem não ser acessíveis, avaliou-se o desempenho dos marcadores HbF e IFN- γ na determinação de risco quando os pacientes são dicotomizados dentre selvagens e polimorfos. Diante disso, tais marcadores apresentaram valores altos de área sobre a curva, mostrando-os promissores ao relacionar as complicações presente na AF com os seus níveis séricos, bem com a presença do polimorfismo.

Esses achados corroboram com os estudos das pesquisadoras Silva, Gonçalves e Martins (2009), as quais demonstraram que níveis de hemoglobina fetal associado a outra ferramenta diagnóstica podem ser usados como fator de prognóstico nos pacientes com anemia falciforme. Em adição, Chen *et al.*, (2022) descobriram que IFN- γ aumentou significamente a expressão de genes que codificam proteínas que estão associadas à pior prognóstico de doenças oncohematológicas, concluindo que IFN- γ regula uma complexa rede de genes que estão associado com a diferenciação de células imunes.

Ademais, Ward *et al.*, (2020) sugeriram que o polimorfismo de IRF4 rs12203592 (C>T) está envolvido com um pior prognóstico do melanoma, visto que a maior expressão de IRF4 leva às células T reguladoras (Tregs) inibirem a resposta imune, permitindo o crescimento e a progressão do tumor. Nessa lógica, acredita-se que a identificação do polimorfismo, sobretudo o alelo T, possam ser indicativos de pior prognóstico na AF, uma vez que o grupo contendo indivíduos com alelo T apresentou maiores concentrações dos parâmetros bioquímicos e de IFN- γ , bem como menores níveis de HbF.

Portanto, considerando que o diagnóstico precoce pode diminuir a morbidade e a mortalidade da AF (DEBAUN *et al.*, 2020), os resultados obtidos no presente estudo, o qual busca avaliar a influência do polimorfismo nos parâmetros laboratoriais e nas implicações clínicas da anemia falciforme, podem ser utilizados na prática clínica como ferramenta auxiliar no diagnóstico e acompanhamento desses pacientes, possibilitando novas estratégias a serem utilizadas na prevenção das implicações clínicas da AF.

Além disso, sabe-se que a equipe multidisciplinar enfrenta dificuldades no acompanhamento do paciente com anemia falciforme, seja pela multiplicidade de sintomas/complicações, ou pela falta de marcadores laboratoriais sensíveis (BRANDOW; LIEM, 2022). Logo, estes resultados podem ser utilizados como base para novos estudos em torno da descoberta de biomarcadores mais seletivos e específicos que possam ser utilizados na

prática clínica e laboratorial, além de orientar os profissionais de saúde sobre o assunto.

Juntos, os resultados do presente trabalho sugerem que o polimorfismo influencia no perfil clínico-laboratorial de pacientes com anemia falciforme. Portanto, a busca por marcadores genéticos que estão associados com a proteção ou o agravamento das implicações clínicas da AF é extremamente importante, uma vez que os profissionais de saúde podem utilizar dessa ferramenta para alinhar o tratamento de acordo com a necessidade de cada indivíduo (SANTIAGO *et al.*, 2020). Todavia, estudos adicionais com um maior número de pacientes, abrangendo diferentes regiões geográficas e etnias, são necessários para uma melhor compreensão sobre a influência deste fator de transcrição na imunopatogenicidade da AF, associando esse polimorfismo com alterações laboratoriais e manifestações clínicas.

Adicionalmente, o presente trabalho contribuiu também com a literatura ao revelar características genéticas que estão associadas a alterações laboratoriais que refletem na severidade do quadro clínico do paciente falciforme, sendo base para novos estudos sobre o tema. Além disso, espera-se que o estudo contribua com novas descobertas de prognóstico, as quais poderiam ser utilizadas no futuro para evitar implicações clínicas graves da AF, melhorando, assim, a qualidade de vida desses pacientes.

6. CONCLUSÃO

Levando em consideração os achados do trabalho, conclui-se que os parâmetros bioquímicos sofrem influência do genótipo, do alelo e do uso da hidroxiureia. O genótipo C/C e o alelo C apresentaram maior frequência na população estudada, a qual não se encontra em equilíbrio com o princípio de Hardy-Weinberg. O grupo com AF apresentou maiores níveis de IFN- γ do que o controle. Os grupos polimórficos (C/T e T/T) e o grupo contendo pacientes com alelo T apresentaram maiores concentrações de IFN- γ e de reticulócitos, bem como maior atividade de BD, ALT, FA, GGT. Entretanto, C/T e T/T tiveram menores níveis de Ht e HbF. Dentre os pacientes que não fazem uso de HU, C/C apresentou maiores concentrações de HbF. C/T e T/T apresentam uma maior frequência de complicações graves da AF, como hepatomegalia, alterações renais e crise-vaso-oclusivas; bem como maiores chances de desenvolverem hepatite, STA, necrose óssea e úlcera de membros. A correlação positiva entre os níveis séricos de IFN- γ e biomarcadores sugere que essa citocina está associada a danos hepáticos. Já a correlação negativa entre HbF e IFN-gama indica que as duas substâncias apresentam comportamento distinto na AF. Por fim, os níveis de HbF e de INF- γ são potenciais ferramentas de prognóstico da AF.

REFERÊNCIAS

ADESINA, Oyebimpe O.; NEUMAYR, Lynne D.. Osteonecrosis in sickle cell disease: an update on risk factors, diagnosis, and management. **Hematology**, [S.L.], v. 2019, n. 1, p. 351-358, 6 dez. 2019.

AEDDULA, Narothama R.; BARDHAN, Mainak; BARADHI, Krishna M. Sickle Cell Nephropathy. **StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing**, 12 set. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526017/>. Acessado em: 24 maio 2023.

AGNARELLI, Alessandro; CHEVASSUT, Tim; MANCINI, Erika J.. IRF4 in multiple myeloma—Biology, disease and therapeutic target. **Leukemia Research**, [S.L.], v. 72, p. 52-58, set. 2018.

ALAMDARI, Azam; MINOO, Farzaneh Sadat; ASSADIASL, Sara; FREIDOOON, Mahboobeh; POUR-REZA-GHOLI, Fatemeh; SOLEIMANIFAR, Narjes; MOHEBBI, Bahareh; SADR, Maryam; PEZESHKI, Mahboob Lesan; NICKNAM, Mohammad Hossein. Expression of Programmed Cell Death 1 and Helios Genes Correlates With rs872071A>G and rs12203592C>T Single-Nucleotide Polymorphisms of InterferonRegulatory Factor 4 in Patients with T-Cell-Mediated Rejection of Renal Allograft. **Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation**, vol. 20, nº 2, p. 190–198, 1 fev. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34981715/>. Acessado em: 25 maio 2023.

ALKHAYYAT, Motasem; SALEH, Mohannad Abou; ZMAILI, Mohammad; SANGHI, Vedha; SINGH, Tavankit; ROUPHAEL, Carol; SIMONS-LINARES, C. Roberto; ROMERO-MARRERO, Carlos; CAREY, William D.; LINDENMEYER, Christina C. Successful liver transplantation for acute sickle cell intrahepatic cholestasis: A case report and review of the literature. **World journal of hepatology**, vol. 12, nº 3, p. 108–115, 27 mar. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32231764/>. Acessado em: 25 maio 2023.

ALKINDI, Salam; AL-BUSAIDI, Ikhlâs; AL-SALAMI, Bushra; RANIGA, Samir; PATHARE, Anil; BALLAS, Samir K.. Predictors of impending acute chest syndrome in patients with sickle cell anaemia. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-1, 12 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC.

Allali, S., Taylor, M., Brice, J., & Montalembert, M. d. M. Chronic organ injuries in children with sickle cell disease. **Haematologica**, 106(6), 1535–1544, 2021.

ALLARD, Pierre; ALHAJ, Nareen; LOBITZ, Stephan; CARIO, Holger; JARISCH, Andreas; GROSSE, Regine; OEVERMANN, Lena; HAKIMEH, Dani; TAGLIAFERRI, Laura; KOHNE, Elisabeth. Genetic modifiers of fetal hemoglobin affect the course of sickle cell disease in patients treated with hydroxyurea. **Haematologica**, [S.L.], v. 107, n. 7, p. 1577-1588, 28 out. 2021.

ALSHAHRI, Mohammeds; ALGHAMDI, Mohammada. Ketamine for Sickle Cell Vaso-Occlusive Crises: a systematic review. **Saudi Journal Of Medicine And Medical Sciences**,

[S.L.], v. 9, n. 1, p. 3, 2021.

AMARAPURKAR, Pooja; ROBERTS, Levard; NAVARRETE, Jose; RASSI, Fuad El. Sickle Cell Disease and Kidney. **Advances In Chronic Kidney Disease**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 141-148.1, mar. 2022.

ANTONCZYK, Aleksandra; KRIST, Bart; SAJEK, Malgorzata; MICHALSKA, Agata; PIASZYK-BORYCHOWSKA, Anna; PLENS-GALASKA, Martyna; WESOLY, Joanna; BLUYSSSEN, Hans A. R.. Direct Inhibition of IRF-Dependent Transcriptional Regulatory Mechanisms Associated With Disease. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 10, p. 1-1, 24 maio 2019.

ASHOROBI, Damilola; RAMSEY, Adam; YARRARAPU, Siva Naga S.; BHATT, Ruchi. Sickle Cell Trait. **Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management, Second Edition**, p. 549–563, 18 jul. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537130/>. Acessado em: 23 abr. 2023.

ASSLABER, Daniela; QI, Yuan; MAEDING, Nicole; STEINER, Markus; DENK, Ursula; HÖPNER, Jan Philip; HARTMANN, Tanja Nicole; ZABORSKY, Nadja; GREIL, Richard; EGGLE, Alexander. B-cell-specific IRF4 deletion accelerates chronic lymphocytic leukemia development by enhanced tumor immune evasion. **Blood**, [S.L.], v. 134, n. 20, p. 1717-1729, 19 set. 2019.

ATAGA, Kenneth I.; ORRINGER, Eugene P.. Renal abnormalities in sickle cell disease. **American Journal Of Hematology**, [S.L.], v. 63, n. 4, p. 205-211, abr. 2000.

ATAGA, Kenneth I.; SARAF, Santosh L.; DEREBAİL, Vimal K.. The nephropathy of sickle cell trait and sickle cell disease. **Nature Reviews Nephrology**, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 361-377, 21 fev. 2022.

BALLAS, Samir K.; LIEFF, Susan; BENJAMIN, Lennette J.; DAMPIER, Carlton D.; HEENEY, Matthew M.; HOPPE, Carolyn; JOHNSON, Cage S.; ROGERS, Zora R.; SMITH-WHITLEY, Kim; WANG, Winfred C.. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **American Journal Of Hematology**, [S.L.], 2009.

BECK, Carolyn e; TROTTIER, Evelyne D; KIRBY-ALLEN, Melanie; PASTORE, Yves. Acute complications in children with sickle cell disease: prevention and management. **Paediatrics & Child Health**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 50-55, 1 mar. 2022.

BELISÁRIO, André R; SILVA, Ariadna As da; SILVA, Cristiane Vm; SOUZA, Larissa Mg de; A WAKABAYASHI, Eduarda; A ARAĐJO, Stanley de; SIMOES-E-SILVA, Ana C. Sickle cell disease nephropathy: an update on risk factors and potential biomarkers in pediatric patients. **Biomarkers In Medicine**, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 965-985, ago. 2019.

BODDICKER, Rebecca L.; KIP, N. Sertac; XING, Xiaoming; ZENG, Yu; YANG, Zhi-Zhang; LEE, Jeong-Heon; ALMADA, Luciana L.; ELSAWA, Sherine F.; KNUDSON, Ryan A.; LAW, Mark E.. The oncogenic transcription factor IRF4 is regulated by a novel CD30/NF-κB positive feedback loop in peripheral T-cell lymphoma. **Blood**, [S.L.], v. 125, n. 20, p. 3118-3127, 14 maio 2015.

BRANDOW, A. M.; LIEM, R. I.. Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease. **Journal Of Hematology & Oncology**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-1, 3 mar. 2022.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA Nº 55, DE 29 DE JANEIRO DE 2010. 2022. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2010/prt0055_29_01_2010.html. Acesso em: 23 jan. 2023.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Doença falciforme: condutas básicas para o tratamento. Brasília: **Ministério da Saúde**; 2013. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_condutas_basicas.pdf. Acesso em: 10 out 2022.

CANÇADO, Rodolfo D.; LOBO, Clarisse; ANGULO, Ivan L.; ARAËJO, Paulo I. C.; JESUS, Joice A.. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 361-366, 2009.

CAO, Huan; VICKERS, Mark A.. Oxidative stress, malaria, sickle cell disease, and innate immunity. **Trends In Immunology**, [S.L.], v. 42, n. 10, p. 849-851, out. 2021.

CAVALCANTE, Jânio Emanuel Andrade; MACHADO, Rosângela Pinheiro Gonçalves; LAURENTINO, Marília Rocha; SANTOS, Talyta Ellen de Jesus dos; BANDEIRA, Izabel Cristina Justino; MAIA FILHO, Pedro Aurio; FIGUEIREDO, Monalisa Feliciano; MARTINS, Alice Maria Costa; LEMES, Romélia Pinheiro Gonçalves. Clinical events and their relation to the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genotypes in Sickle-Cell-Anemia patients. **Hematology/Oncology And Stem Cell Therapy**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 14-19, mar. 2016.

CAVALCANTI, Juliana Manzoni. Racial mixture, blood and nation in medical publications on sickle cell disease in 1950s Brazil. **History And Philosophy Of The Life Sciences**, [S.L.], v. 41, n. 4, p. 1-1, 30 out. 2019.

CHAGAS, Mariana do Sacramento; FRIGGI, Juliana Ramos. Principais manifestações hepáticas na doença falciforme. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 11, n. 15, p. 441111537486, 22 nov. 2022.

CHEMINET, G.; MEKONTSO-DESSAP, A.; POUCHOT, J.; ARLET, J.-B.. Syndrome thoracique aigu chez les patients drépanocytaires adultes. **La Revue de Médecine Interne**, [S.L.], v. 43, n. 8, p. 470-478, ago. 2022.

CHEN, Yixiang; SHAO, Xiaoya; YANG, Haiping; REN, Leiying; CUI, Ying; ZHANG, Wenlu; MACIP, Salvador; MENG, Xueqiong. Interferon gamma regulates a complex pro-survival signal network in chronic lymphocytic leukemia. **European Journal Of Haematology**, [S.L.], p. 1-1, 12 jan. 2023.

CHERIAN, Mathew A.; OLSON, Sydney; SUNDARAMOORTHY, Hemalatha; CATES, Kitra; CHENG, Xiaogang; HARDING, John; MARTENS, Andrew; CHALLEN, Grant A.; TYAGI, Manoj; RATNER, Lee. An activating mutation of interferon regulatory factor 4 (IRF4) in adult T-cell leukemia. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 293, n. 18, p. 6844-6858, maio 2018.

CHHABRA, Yash; YONG, Hilary X.L.; FANE, Mitchell E.; SOOGRIM, Arish; LIM, Wen; MAHIUDDIN, Dayana Nur; KIM, Reuben S.Q.; ASHCROFT, Melinda; BEATSON, Scott A.; AINGER, Stephen A.. Genetic variation in IRF4 expression modulates growth characteristics, tyrosinase expression and interferon-gamma response in melanocytic cells. **Pigment Cell & Melanoma Research**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 51-63, 23 out. 2017.

CISNEROS, Gabriel Salinas; THEIN, Swee L.. Recent Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease. **Frontiers In Physiology**, [S.L.], v. 11, p. 1-1, 20 maio 2020.

COOK, Sarah L.; FRANKE, Marissa C.; SIEVERT, Evelyn P.; SCIAMMAS, Roger. A Synchronous IRF4-Dependent Gene Regulatory Network in B and Helper T Cells Orchestrating the Antibody Response. **Trends In Immunology**, [S.L.], v. 41, n. 7, p. 614-628, jul. 2020.

COOPER, Tess e; HAMBLETON, Ian R; BALLAS, Samir K; A CASHMORE, Brydee; WIFFEN, Philip J. Pharmacological interventions for painful sickle cell vaso-occlusive crises in adults. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, [S.L.], v. 2020, n. 2, p. 1-1, 19 nov. 2019.

CORDEIRO, Patrícia Azevedo Soares; ASSONE, Tatiane; PRATES, Gabriela; TEDESCHI, Marcia Regina Martinez; FONSECA, Luiz Augusto Marcondes; CASSEB, Jorge. The role of IFN- γ production during retroviral infections: an important cytokine involved in chronic inflammation and pathogenesis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.L.], v. 64, p. 1-1, 2022.

DAAK, Ahmed A.; ELSAMANI, Elfatih; ALI, Eltigani H.; A MOHAMED, Fatma; ABDEL-RAHMAN, Manar E.; ELDERDERY, Abozer Y.; TALBOT, Octavious; KRAFT, Peter; GHEBREMESKEL, Kebreab; ELBASHIR, Mustafa I.. Sickle cell disease in western Sudan: genetic epidemiology and predictors of knowledge attitude and practices. **Tropical Medicine & International Health**, [S.L.], v. 21, n. 5, p. 642-653, 29 mar. 2016.

DALTRO, Paula B.; RIBEIRO, Tiago O.; DALTRO, Gildásio C.; MEYER, Roberto J.; FORTUNA, Vitor. CD4+ T Cell Profile and Activation Response in Sickle Cell Disease Patients with Osteonecrosis. **Mediators Of Inflammation**, [S.L.], v. 2020, p. 1-12, 9 out. 2020.

DARBARI, Deepika S.; SHEEHAN, Vivien A.; BALLAS, Samir K.. The vaso-occlusive pain crisis in sickle cell disease: definition, pathophysiology, and management. **European Journal Of Haematology**, [S.L.], v. 105, n. 3, p. 237-246, 19 maio 2020.

DAVIES, S C. The vaso-occlusive crisis of sickle cell disease. **Bmj**, [S.L.], v. 302, n. 6792, p. 1551-1552, 29 jun. 1991.

DE, Aliva; AGRAWAL, Sabhyata; MORRONE, Kerry; ZHANG, Jinghang; BJORKLUND, Nicole L.; MANWANI, Deepa; RASTOGI, Deepa. Airway Inflammation and Lung Function in Sickle Cell Disease. **Pediatric Allergy, Immunology, And Pulmonology**, [S.L.], v. 32, n. 3, p. 92-102, 1 set. 2019.

DEBAUN, M. R.; JORDAN, L. C.; KING, A. A.; SCHATZ, J.; VICHINSKY, E.; FOX, C. K.; MCKINSTRY, R. C.; TELFER, P.; KRAUT, M. A.; DARAZ, L.. American Society of Hematology 2020 guidelines for sickle cell disease: prevention, diagnosis, and treatment of cerebrovascular disease in children and adults. **Blood Advances**, [S.L.], v. 4, n. 8, p. 1554-1588, 16 abr. 2020.

DEMIRCI, Selami; LEONARD, Alexis; ESSAWI, Khaled; TISDALE, John F.. CRISPR-Cas9 to induce fetal hemoglobin for the treatment of sickle cell disease. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**, [S.L.], v. 23, p. 276-285, dez. 2021.

DOLATKHAH, Roya; DASTGIRI, Saeed. Blood transfusions for treating acute chest syndrome in people with sickle cell disease. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, [S.L.], v. 2020, n. 1, p. 1-1, 16 jan. 2020.

DUTRA, Valéria de Freitas; BIASI, Thais Priscila; FIGUEIREDO, Maria Stella. Sickle cell anemia: hierarchical cluster analysis and clinical profile in a cohort in Brazil. *Hematology, Transfusion And Cell Therapy*, [S.L.], p. 1-1, dez. 2021.

ELLIOTT, Laine; ASHLEY-KOCH, Allison E.; CASTRO, Laura de; JONASSAINT, Jude; PRICE, Jennifer; ATAGA, Kenneth I.; LEVESQUE, Marc C.; WEINBERG, J. Brice; ECKMAN, James R.; ORRINGER, Eugene P.. Genetic polymorphisms associated with priapism in sickle cell disease. **British Journal Of Haematology**, [S.L.], v. 137, n. 3, p. 262-267, maio 2007.

FONTELLES, Mauro J.; SIMÕES, Marilda G.; ALMEIDA Jairo C.; Metodologia da pesquisa: diretrizes para o cálculo do tamanho da amostra. **Revista Paraense de Medicina**, [S.L.], v. 24, n.2. 2010.

GAO, Denny K.; SALOMONIS, Nathan; HENDERLIGHT, Maggie; WOODS, Christopher; THAKKAR, Kairavee; GROM, Alexei A.; THORNTON, Sherry; JORDAN, Michael B.; WIKENHEISER-BROKAMP, Kathryn A.; SCHULERT, Grant S.. IFN- γ is essential for alveolar macrophage-driven pulmonary inflammation in macrophage activation syndrome. **Jci Insight**, [S.L.], v. 6, n. 17, p. 1-1, 8 set. 2021.

GRANJA, Paula Dadalti; QUINTÃO, Samuel Braulio Magalhães; PERONDI, Franciele; LIMA, Rosemary Bacellar Ferreira de; MARTINS, Cláudia Labriola de Medeiros; MARQUES, Marcos Arêas; OLIVEIRA, Julio Cesar Peclat de. Úlceras de perna em pacientes com anemia falciforme. **Jornal Vascular Brasileiro**, [S.L.], v. 19, p. 1-1, 2020.

GRUSDAT, M; MCILWAIN, D R; XU, H C; POZDEEV, V I; KNIEVEL, J; CROME, S Q; ROBERT-TISSOT, C; DRESS, R J; A PANDYRA, A; SPEISER, D e. IRF4 and BATF are critical for CD8+ T-cell function following infection with LCMV. **Cell Death & Differentiation**, [S.L.], v. 21, n. 7, p. 1050-1060, 14 fev. 2014.

GUTTERIDGE, C; NEWLAND, A C; SEQUEIRA, J. Hepatic sequestration in sickle cell anemia. **Bmj**, [S.L.], v. 290, n. 6476, p. 1214-1215, 20 abr. 1985.

HASHEMI, Zahra; EBRAHIMZADEH, Mohammad Ali. Hemoglobin F (HbF) Inducers; History, Structure and Efficacies. **Mini-Reviews In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 22, n. 1,

p. 52-68, jan. 2022.

HEMOCE, 2011. Disponível em: < <https://www.hemoce.ce.gov.br/institucional/o-hemoce/> >. Acesso em: 18/05/2022.

HENRY, Eric R.; CELLMER, Troy; DUNKELBERGER, Emily B.; METAFERIA, Belhu; HOFRICHTER, James; LI, Quan; OSTROWSKI, David; GHIRLANDO, Rodolfo; LOUIS, John M.; MOUTEREAU, Stéphane. Allosteric control of hemoglobin S fiber formation by oxygen and its relation to the pathophysiology of sickle cell disease. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 117, n. 26, p. 15018-15027, 11 jun. 2020.

HOGEN, Rachel; KIM, Michelle; LEE, Yelim; LO, Mary; KAUR, Navpreet; KAHN, Jeff; CHOPRA, Shefali; QAZI, Yasir; SEDRA, Ashraf; KIM, Jim. Liver Transplantation in Patients with Sickle Cell Disease in the United States. **Journal Of Surgical Research**, [S.L.], v. 255, p. 23-32, nov. 2020.

HULSIZER, Joseph; RESURRECCION, W. Kyle; SHI, Zhuqing; WEI, Jun; LADSON-GARY, Skylar; ZHENG, S. Lilly; HELFAND, Brian T.; BILLINGS, Liana; CAPLAN, Michael S.; XU, Jianfeng. Sickle Cell Trait and Risk for Common Diseases: evidence from the uk biobank. **The American Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 135, n. 8, p. 279-287, ago. 2022.

INUSA, Baba; HSU, Lewis; KOHLI, Neeraj; PATEL, Anissa; OMINU-EVBOTA, Kilali; ANIE, Kofi; ATOYEBI, Wale. Sickle Cell Disease—Genetics, Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatment. **International Journal Of Neonatal Screening**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 20, 7 maio 2019.

JEFFERIES, Caroline A.. Regulating IRFs in IFN Driven Disease. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 10, p. 1-1, 29 mar. 2019.

JORGOVANOVIC, Dragica; SONG, Mengjia; WANG, Liping; ZHANG, Yi. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. **Biomarker Research**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-1, 29 set. 2020.

KAMBALE-KOMBI, Paul; DJANG'EING'A, Roland Marini; OPARA, Jean-Pierre Alworong'a; MUKONKOLE, Jean-Paulin Mbo; BOURS, Vincent; LUPAKA, Dieu-Merci Mbumba; TONEN-WOLYEC, Serge; BOME, Lucien Bolukaoto; TSHILUMBA, Charles Kayembe; BATINA-AGASA, Salomon. RENAL ABNORMALITIES AMONG SICKLE CELL DISEASE PATIENTS IN A POOR MANAGEMENT SETTING: a survey in the democratic republic of the congo. **Mediterranean Journal Of Hematology And Infectious Diseases**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 2022046, 29 jun. 2022.

KATO, Gregory J.; PIEL, Frédéric B.; REID, Clarice D.; GASTON, Marilyn H.; OHENE-FREMPONG, Kwaku; KRISHNAMURTI, Lakshmanan; SMITH, Wally R.; PANESE, Julie A.; WEATHERALL, David J.; COSTA, Fernando F.. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-4, 15 mar. 2018.

KHALED, Monia Ben; OUEDERNI, Monia; MANKAI, Yosra; REKAYA, Samia; FRAJ, Ilhem Ben; DHOUIB, Nawel; KOUKI, Ridha; MELLOULI, Fethi; BEJAOU, Mohamed. Prevalence and predictive factors of splenic sequestration crisis among 423 pediatric patients with sickle cell disease in Tunisia. **Blood Cells, Molecules, And Diseases**, [S.L.], v. 80, p.

102374, fev. 2020.

KHANDROS, Eugene; BLOBEL, Gerd A.. Heterogeneity of fetal hemoglobin production in adult red blood cells. **Current Opinion In Hematology**, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 164-170, 23 fev. 2021.

KHORSHIED, Mervat M.; MOHAMED, Nohair S.; HAMZA, Rania S.; ALI, Rasha M.; EL-GHAMRAWY, Mona K.. Protein Z and Endothelin-1 genetic polymorphisms in pediatric Egyptian sickle cell disease patients. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 22264, 26 maio 2018.

KICHAEV, Gleb; BHATIA, Gaurav; LOH, Po-Ru; GAZAL, Steven; BURCH, Kathryn; FREUND, Malika K.; SCHOECH, Armin; PASANIUC, Bogdan; PRICE, Alkes L.. Leveraging Polygenic Functional Enrichment to Improve GWAS Power. **The American Journal Of Human Genetics**, [S.L.], v. 104, n. 1, p. 65-75, jan. 2019.

KOS, O.; ALEXANDER, C.; BRANDENBURG, K.; CHEN, Z.; HEINI, A.; HEUMANN, D.; KHATRI, I.; MACH, J.P.; RIETSCHER, E.T.; TERSIKH, A.. Regulation of fetal hemoglobin expression during hematopoietic stem cell development and its importance in bone metabolism and osteoporosis. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 57, p. 112-120, abr. 2018.

KYRANA, Eirini; REES, David; LACAÏLLE, Florence; FITZPATRICK, Emer; DAVENPORT, Mark; HEATON, Nigel; HEIGHT, Sue; SAMYN, Marianne; MAVILIO, Fulvio; BROUSSE, Valentine. Clinical management of sickle cell liver disease in children and young adults. **Archives Of Disease In Childhood**, [S.L.], v. 106, n. 4, p. 315-320, 11 nov. 2020.

LANARO, C; FRANCO-PENTEADO, C F; ALBUQUEQUE, D M; SAAD, S T O; CONRAN, N; COSTA, F F. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **Journal Of Leukocyte Biology**, [S.L.], v. 85, n. 2, p. 235-242, 12 nov. 2008.

LAURENTINO, Marília Rocha; MAIA FILHO, Pedro Aurio; BARBOSA, Maritza Cavalcante; BANDEIRA, Izabel Cristina Justino; ROCHA, Lillianne Brito da Silva; GONÇALVES, Romelia Pinheiro. Influence of β S-globin haplotypes hydroxyurea on tumor necrosis factor-alpha levels in sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 121-125, mar. 2014.

LEE, Jihyung; ZHANG, Junyan; CHUNG, Young-Jun; KIM, Jun Hwan; KOOK, Chae Min; GONZÁLEZ-NAVAJAS, José M; HERDMAN, David s; NÜRNBERG, Bernd; A INSEL, Paul; CORR, Maripat. Inhibition of IRF4 in dendritic cells by PRR-independent and -dependent signals inhibit Th2 and promote Th17 responses. **Elife**, [S.L.], v. 9, p. 1, 4 fev. 2020.

LEE, Ming-Chin; LACEY, Derek C.; FLEETWOOD, Andrew J.; ACHUTHAN, Adrian; HAMILTON, John A.; COOK, Andrew D.. GM-CSF- and IRF4-Dependent Signaling Can Regulate Myeloid Cell Numbers and the Macrophage Phenotype during Inflammation. **The**

Journal Of Immunology, [S.L.], v. 202, n. 10, p. 3033-3040, 15 maio 2019.

LIEM, Robert I.; LANZKRON, Sophie; COATES, Thomas D.; DECASTRO, Laura; DESAI, Ankit A.; ATAGA, Kenneth I.; COHEN, Robyn T.; HAYNES, Johnson; OSUNKWO, Ifeyinwa; LEBENSBURGER, Jeffrey D.. American Society of Hematology 2019 guidelines for sickle cell disease: cardiopulmonary and kidney disease. **Blood Advances**, [S.L.], v. 3, n. 23, p. 3867-3897, 3 dez. 2019.

LÓPEZ-GARCÍA, Lucero; CASTRO-MANRREZA, Marta E.. TNF- α and IFN- γ Participate in Improving the Immunoregulatory Capacity of Mesenchymal Stem/Stromal Cells: importance of cell-cell contact and extracellular vesicles. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 17, p. 9531, 2 set. 2021.

LUBECK, Deborah; AGODOA, Irene; BHAKTA, Nickhill; DANESE, Mark; PAPPU, Kartik; HOWARD, Robin; GLEESON, Michelle; HALPERIN, Marc; LANZKRON, Sophie. Estimated Life Expectancy and Income of Patients With Sickle Cell Disease Compared With Those Without Sickle Cell Disease. **Jama Network Open**, [S.L.], v. 2, n. 11, p. 1-1, 15 nov. 2019.

MANDAL, Amit Kumar; MITRA, Amrita; DAS, Rajdeep. Sickle Cell Hemoglobin. **Subcellular Biochemistry**, [S.L.], p. 297-322, 2020.

MANGLA, Ankit; EHSAN, Moavia; AGARWAL, Nikki; MARUVADA, Smita. Sickle Cell Anemia. **Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition**, , p. 429-431, 30 nov. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482164/>. Acessado em: 25 maio 2023.

MARTÍ-CARVAJAL, Arturo J; CONTERNO, Lucieni O; KNIGHT-MADDEN, Jennifer M. Antibiotics for treating acute chest syndrome in people with sickle cell disease. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, [S.L.], v. 2021, n. 4, p. 1-1, 18 set. 2019.

MARTINS, Ana; SILVA, Giulia; CARVALHO, Jeimisson; FARIA, Laura; MAIA, Lhanne; JORGE, Luisa. A IMPORTÂNCIA DA TRIAGEM DE ANEMIA FALCIFORME PELO TESTE DO PEZINHO NO SUS. **Ciências Biológicas e da Saúde**: integrando saberes em diferentes contextos, [S.L.], p. 29-36, 2022.

MAWULI, Gifty; DZUDZOR, Bartholomew; TACHI, Kenneth; KUMA, Amma Anima Benneh-Akwasi; ODAME-ABOAGYE, James; OBENG, Billal Musah; BOATENG, Anthony Twumasi; EDU-QUANSAH, Elijah Paa; ATTIKU, Keren Okyerebea; AGBOSU, Esinam. Hepatitis C virus (HCV) infection among patients with sickle cell disease at the Korle-Bu teaching hospital. **Virology Journal**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-1, 22 abr. 2022.

MCDANIEL, Margaret M.; KOTTYAN, Leah C.; SINGH, Harinder; PASARE, Chandrashekhar. Suppression of Inflammasome Activation by IRF8 and IRF4 in cDCs Is Critical for T Cell Priming. **Cell Reports**, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 107604, maio 2020.

MCGANN, Patrick T; WARE, Russell e. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. **Expert Opinion On Drug Safety**, [S.L.], v. 14, n. 11, p. 1749-1758, 14 set. 2015.

MEHRABANI, Sanaz. Abdominal pain in a patient with sickle cell disease with multiple

complications. **Türk Pediatri Arşivi**, [S.L.], p. 1-1, 2019.

MERLI, Pietro; QUINTARELLI, Concetta; STROCCHIO, Luisa; LOCATELLI, Franco. The role of interferon-gamma and its signaling pathway in pediatric hematological disorders. **Pediatric Blood & Cancer**, [S.L.], v. 68, n. 4, p. 1-1, 23 jan. 2021.

MERTENS, J.; RAMADORI, G.; MIHM, S.. Functional relevance of the IRF-1 promoter polymorphism rs2549009 on transcriptional activity in a native genomic environment. Human Molecular Genetics, [S.L.], v. 19, n. 23, p. 4587-4594, 15 set. 2010.

MILNER, Paul F.; KRAUS, Alfred P.; SEBES, Jenő I.; SLEEPER, Lynn A.; DUKES, Kimberly A.; EMBURY, Stephen H.; BELLEVUE, Rita; KOSHY, Mabel; MOOHR, John W.; SMITH, Jeanne. Sickle Cell Disease as a Cause of Osteonecrosis of the Femoral Head. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 325, n. 21, p. 1476-1481, 21 nov. 1991.

MONFORT, Jean-Benoît; SENET, Patricia. Leg Ulcers in Sickle-Cell Disease: treatment update. **Advances In Wound Care**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 348-356, 1 jun. 2020.

NAOUM, Paulo Cesar; SOUZA, Patrícia Caetano de. Avaliação dos produtos da degradação oxidativa da Hb S nos genótipos SS, SF (S/beta0 talassemia) e AS, em comparação com hemoglobinas normais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.L.], v. 40, n. 4, p. 249-259, ago. 2004.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. rs12203592 RefSNP Report - dbSNP - NCBI: rs12202592. 2022. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs12203592?horizontal_tab=true. Acesso em: 23 mai. 2023.

OGU, Ugochi O; BADAMOSI, Nnenna u; CAMACHO, Pamela e; FREIRE, Amado X; ADAMS-GRAVES, Patricia. Management of Sickle Cell Disease Complications Beyond Acute Chest Syndrome. **Journal Of Blood Medicine**, [S.L.], v. 12, p. 101-114, fev. 2021.

OKONGWU, C. I.; FASOLA, F. A.; ADEKANMI, A. J.; ONIFADE, A. A. Morbidity pattern and interferon gamma level in sickle cell anemia patients with autosplenectomy. **Nigerian journal of clinical practice**, vol. 21, nº 12, p. 1615–1621, 1 dez. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30560826/>. Acessado em: 29 maio 2023.

ONIMO, Grace; ROTZ, Seth. Sickle cell disease: a primary care update. **Cleveland Clinic Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 87, n. 1, p. 19-27, jan. 2020.

PAIVA, Gabriella Silvestre; MORAIS, Rita de Cássia Melão de; MARTINS, Gisele; NASCIMENTO, Luciana de Cássia Nunes. O conhecimento de crianças e adolescentes com anemia falciforme sobre seu autocuidado. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 11, n. 7, p. 27311729934, 23 maio 2022.

PAYÁN-PERNÍA, Salvador; LLOBET, Anna Ruiz; SEVILLA, Ángel F. Remacha; EGIDO, Jesús; CASTÁN, José Aurelio Ballarín; MORENO, Juan Antonio. Nefropatía falciforme. Manifestaciones clínicas y nuevos mecanismos implicados en el daño renal. **Nefrología**, [S.L.], v. 41, n. 4, p. 373-382, jul. 2021.

PECKER, Lydia H.; NAIK, Rakhi P.. The current state of sickle cell trait: implications for reproductive and genetic counseling. **Blood**, [S.L.], v. 132, n. 22, p. 2331-2338, 29 nov. 2018.

PIEL, Frédéric B.; PATIL, Anand P.; HOWES, Rosalind E.; NYANGIRI, Oscar A.; GETHING, Peter W.; WILLIAMS, Thomas N.; WEATHERALL, David J.; HAY, Simon I.. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. **Nature Communications**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-1, 2 nov. 2010.

POTRONY, Miriam; REBOLLO-MORELL, Aida; GIMÉNEZ-XAVIER, Pol; ZIMMER, Lisa; PUIG-BUTILLE, Joan Anton; TELL-MARTI, Gemma; SUCKER, Antje; BADENAS, Celia; CARRERA, Cristina; MALVEHY, Josep. IRF4 rs12203592 functional variant and melanoma survival. **International Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 140, n. 8, p. 1845-1849, 6 fev. 2017.

PRAHARAJ, Dibya L.; ANAND, Anil C.. Sickle Hepatopathy. **Journal Of Clinical And Experimental Hepatology**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 82-96, jan. 2021.

RODENKIRCHEN, Vera; SCHETTGEN, Thomas; RINK, Lothar. Zinc deficiency impairs interferon- γ production on post-transcriptional level. **Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology**, [S.L.], v. 62, p. 126598, dez. 2020.

ROSENFELD, Luiz Gastão; BACAL, Nydia Strachman; CUDER, Maria Alice Martins; SILVA, Alanna Gomes da; MACHADO, Ísis Eloah; PEREIRA, Cimar Azereido; SOUZA, Maria de Fátima Marinho de; MALTA, Deborah Carvalho. Prevalência de hemoglobinopatias na população adulta brasileira: pesquisa nacional de saúde 2014-2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 1-1, 2019.

SAAD, S T O; ARRUDA, V R; JUNQUEIRA, O O M D; A SCHELINI, F; COELHO, O B. Acute myocardial infarction in sickle cell anaemia associated with severe hypoxia. **Postgraduate Medical Journal**, [S.L.], v. 66, n. 782, p. 1068-1070, 1 dez. 1990.

SALES, Rahyssa Rodrigues; NOGUEIRA, Bárbara Lisboa; TOSATTI, Jéssica Abdo Gonçalves; GOMES, Karina Braga; LUIZON, Marcelo Rizzatti. Do Genetic Polymorphisms Affect Fetal Hemoglobin (HbF) Levels in Patients With Sickle Cell Anemia Treated With Hydroxyurea? A Systematic Review and Pathway Analysis. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 12, n. 0, p. 1-1, 21 jan. 2022.

SAMUEL, Shirly S.; JAIN, Nikita. Sickle Cell Hepatopathy. **StatPearls**, 12 dez. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574502/>. Acessado em: 24 maio 2023.

SÁNCHEZ-MALDONADO, Jose Manuel; MARTÍNEZ-BUENO, Manuel; CANHÃO, Helena; HORST, Rob Ter; MUÑOZ-PEÑA, Sonia; MOÑIZ-DÍEZ, Ana; RODRÍGUEZ-RAMOS, Ana; ESCUDERO, Alejandro; SORENSEN, Signe B.; HETLAND, Merete L.. NFKB2 polymorphisms associate with the risk of developing rheumatoid arthritis and response to TNF inhibitors: results from the repair consortium. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-1, 9 mar. 2020.

SANTIAGO, Rayra Pereira; FIGUEIREDO, Camylla Vilas Boas; FIUZA, Luciana Magalhães; YAHOUÉDÉHOU, Sétonji Cocou Modeste Alexandre; OLIVEIRA, Rodrigo Mota; ALELUIA, Milena Magalhães; CARVALHO, Suellen Pinheiro; FONSECA, Cleverson

Alves; NASCIMENTO, Valma Maria Lopes; ROCHA, Larissa Carneiro. TGFBR3 Polymorphisms (rs1805110 and rs7526590) Are Associated with Laboratory Biomarkers and Clinical Manifestations in Sickle Cell Anemia. **Disease Markers**, [S.L.], v. 2020, p. 1-9, 30 set. 2020.

SANTOLI, F; ZERAH, F; VASILE, N; BACHIR, D; GALACTEROS, F; ATLAN, G. Pulmonary function in sickle cell disease with or without acute chest syndrome. **European Respiratory Journal**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 1124-1129, 1 nov. 1998.

SANTOS, Fernando Azenha Bautzer; LEMES, Renan Barbosa; OTTO, Paulo Alberto. HW_TEST, a program for comprehensive HARDY-WEINBERG equilibrium testing. **Genetics And Molecular Biology**, [S.L.], v. 43, n. 2, p. 1-1, 2020.

SANTOS, Macedônia Pinto dos; MENEZES, Cláudia Patrícia da Silva Ribeiro; COSTA, Débora Cristina Couto Oliveira; CUSTÓDIO, Livia Lopes; SILVA, Débora Pena Batista e; AFONSO, Lucélia Rodrigues; SOUSA, Geziel dos Santos de; GOMES, Ilvana Lima Verde. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE CASOS NOTIFICADOS DA DOENÇA FALCIFORME NO CEARÁ / EPIDEMIOLOGICAL PROFILE OF NOTIFIED CASES OF SICKLE CELL DISEASE IN CEARÁ. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 6840-6852, 2021.

SASAKI, Kensuke; TERKER, Andrew S.; PAN, Yu; LI, Zhilian; CAO, Shirong; WANG, Yinqiu; NIU, Aolei; WANG, Suwan; FAN, Xiaofeng; ZHANG, Ming-Zhi. Deletion of Myeloid Interferon Regulatory Factor 4 (Irf4) in Mouse Model Protects against Kidney Fibrosis after Ischemic Injury by Decreased Macrophage Recruitment and Activation. **Journal Of The American Society Of Nephrology**, [S.L.], v. 32, n. 5, p. 1037-1052, 22 fev. 2021.

SECRETARIA DA SAÚDE. **Hemoce soma mais de 100 mil doações de sangue em 2022**. secretaria da saúde do governo do Ceará. 2023. Disponível em: <https://www.saude.ce.gov.br/2023/01/06/hemoce-soma-mais-de-100-mil-doacoes-de-sangue-em-2022/#:~:text=Pela%20segunda%20vez%20consecutiva%2C%20em,mil%20doa%C3%A7%C3%B5es%20de%20sangue%20recebidas..> Acesso em: 14 jul. 2023.

SILVA, Lilianne B.; GONÇALVES, Romélia P.; MARTINS, Michele F.. Estudo da correlação entre os níveis de hemoglobina fetal e o prognóstico dos pacientes com anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 31, n. 6, p. 417-420, 2009.

SOUZA, Natânia Pereira de. O Impacto dos Aspectos ambientais na Qualidade de Vida Das Pessoas com Doença Falciforme. **Saúde e Desenvolvimento Humano**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-1, 26 fev. 2021.

STEINBERG, Martin H.. 6 Pathophysiology of sickle cell disease. **Baillière'S Clinical Haematology**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 163-184, mar. 1998.

STEINBERG, Martin H.. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, [S.L.], v. 136, n. 21, p. 2392-2400, 19 nov. 2020.

STUART, Marie J.; SETTY, B.N. Yamaja. Sickle Cell Acute Chest Syndrome: pathogenesis and rationale for treatment. **Blood**, [S.L.], v. 94, n. 5, p. 1555-1560, 1 set. 1999. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.v94.5.1555>.

SUDDLE, Abid R.. Management of liver complications in sickle cell disease. **Hematology**, [S.L.], v. 2019, n. 1, p. 345-350, 6 dez. 2019.

SUNDARARAJ, Srinivasan; SENEVIRATNE, Sandali; WILLIAMS, Simon J; ENDERS, Anselm; CASAROTTO, Marco G. Structural determinants of the IRF4/DNA homodimeric complex. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 2255-2265, 3 fev. 2021.

SUNDD, Prithu; GLADWIN, Mark T.; NOVELLI, Enrico M.. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 263-292, 24 jan. 2019.

TALL, Fatou Gueye; MARTIN, Cyril; NDOUR, El Hadji Malick; FAES, Camille; LY, Indou Dème; PIALOUX, Vincent; CONNES, Philippe; GUEYE, Papa Madieye; DIALLO, Rokhaya Ndiaye; RENOUX, Céline. Influence of Oxidative Stress Biomarkers and Genetic Polymorphisms on the Clinical Severity of Hydroxyurea-Free Senegalese Children with Sickle Cell Anemia. **Antioxidants**, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 863, 14 set. 2020.

TCHOPBA, Christèle Nguepou; KATAWA, Gnatoulma; PADARO, Essohana; TCHADIÉ, Pélagie Edlom; KAROU, Simplicite Damintoti; VOVOR, Ahoefa; AMEYAPOH, Yaovi. Systemic T Cell Subsets and Cytokines in Patients With Homozygous Sickle Cell Disease and Asymptomatic Urinary Tract Infections in Togo. **Ochsner Journal**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 163-172, 2021.

THEOCHARIDOU, Eleni; SUDDLE, Abid R.. The Liver in Sickle Cell Disease. **Clinics In Liver Disease**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 177-189, maio 2019.

THOMASON, Jenna L; OBIH, Uchechukwu M; KOELLE, David M; LOOD, Christian; HUGHES, And Grant. An interferon-gamma release assay as a novel biomarker in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, [S.L.], v. 59, n. 11, p. 3479-3487, 6 maio 2020.

TISDALE, John F.; THEIN, Swee Lay; EATON, William A.. Treating sickle cell anemia. **Science**, [S.L.], v. 367, n. 6483, p. 1198-1199, 13 mar. 2020.

UKESSAYS. Genetic Causes of Sickle Cell Anaemia. 2022. Disponível em: <https://www.ukessays.com/essays/biology/genetic-causes-sickle-cell-anemia-2913.php?vref=1>. Acesso em: 23 jan. 2023.

VATS, Ravi; LIU, Silvia; ZHU, Junjie; MUKHI, Dhanunjay; TUTUNCUOGLU, Egemen; CARDENES, Nayra; SINGH, Sucha; BRZOSKA, Tomasz; KOSAR, Karis; BAMNE, Mikhail. Impaired Bile Secretion Promotes Hepatobiliary Injury in Sickle Cell Disease. **Hepatology**, [S.L.], v. 72, n. 6, p. 2165-2181, 13 nov. 2020.

VINHAES, Caian L.; TEIXEIRA, Rozana S.; MONTEIRO-JÖNIOR, Jay A. S.; TIBÖRCIO, Rafael; CUBILLOS-ANGULO, Juan M.; ARRIAGA, María B.; SABARIN, Adrielle G.; SOUZA, Amâncio J. de; SILVA, Jacqueline J.; LYRA, Isa M.. Hydroxyurea treatment is associated with reduced degree of oxidative perturbation in children and adolescents with sickle cell anemia. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1, 4 nov. 2020.

VIPUL, Shukla; RUNQING, Lu. IRF4 (interferon regulatory factor 4). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2014. Disponível em: <http://atlasgeneticsoncology.org/gene/231/irf4-%28interferon-regulatory-factor-4%29>. Acesso em: 27 dez. 2022.

VISENTAINER, Jeane Eliete Laguila; SELL, Ana Maria; FRANCESCHI, Danilo Alessio; LIEBER, Sofia Rocha; SOUZA, Cármino Antonio de. Importância de polimorfismos de genes reguladores de citocinas em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [S.L.], v. 44, n. 4, p. 739-748, dez. 2008.

WANG, Huanhuan; XIE, Lingzhu; SONG, Xuhong; WANG, Jing; LI, Xinyan; LIN, Zhike; SU, Ting; LIANG, Bin; HUANG, Dongyang. Purine-Induced IFN- γ Promotes Uric Acid Production by Upregulating Xanthine Oxidoreductase Expression. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 13, p. 1-1, 27 jan. 2022.

WARD, S.V.; GIBBS, D.C.; ORLOW, I.; THOMAS, N.e.; KANETSKY, P.A.; LUO, L.; CUST, A.e.; ANTON-CULVER, H.; GRUBER, S.B.; GALLAGHER, R.P.. Association of IRF 4 single-nucleotide polymorphism rs12203592 with melanoma-specific survival. **British Journal Of Dermatology**, [S.L.], v. 183, n. 1, p. 163-165, 19 fev. 2020.

WILSON, Samuel; ELLSWORTH, Patrick; KEY, Nigel S.. Pregnancy in sickle cell trait: what we do and dont know. **British Journal Of Haematology**, [S.L.], v. 190, n. 3, p. 328-335, 17 fev. 2020.

XAVIER, GI; ALBERTIM, Gjb. IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PRECOCE DE HEMOGLOBINOPATIAS. **Hematology, Transfusion And Cell Therapy**, [S.L.], v. 43, p. 504-505, out. 2021.

YAHOUÉDÉHO, Sètonджи Cocou Modeste Alexandre; GUARDA, Caroline Conceição da; FIGUEIREDO, Camylla Vilas Boas; SANTIAGO, Rayra Pereira; CARVALHO, Suellen Pinheiro; FIUZA, Luciana Magalhães; NDIDI, Uche Samuel; OLIVEIRA, Rodrigo Mota; CARVALHO, Magda Oliveira Seixas; NASCIMENTO, Valma Maria Lopes. Hydroxyurea alters hematological, biochemical and inflammatory biomarkers in Brazilian children with SCA: investigating associations with β s haplotype and α -thalassemia. **Plos One**, [S.L.], v. 14, n. 7, p. 0218040, 15 jul. 2019.

YANG, C.; HE, D.; YIN, C.; TAN, J.. Inhibition of Interferon Regulatory Factor 4 Suppresses Th1 and Th17 Cell Differentiation and Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Scandinavian Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 82, n. 4, p. 345-351, 10 set. 2015.

YANG, Quan; XIE, Hongyan; LI, Xing; FENG, Yuanfa; XIE, Shihao; QU, Jiale; XIE, Anqi; ZHU, Yiqiang; ZHOU, Lu; YANG, Jinxue. Interferon Regulatory Factor 4 Regulates the Development of Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cells Through the Transcription of c-Myc in Cancer. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 12, p. 1, 23 fev. 2021.

YE, Liping; HE, Saiqin; MAO, Xinli; ZHANG, Yu; CAI, Yue; LI, Shaowei. Effect of Hepatic Macrophage Polarization and Apoptosis on Liver Ischemia and Reperfusion Injury During Liver Transplantation. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, p. 1-1, 26 jun. 2020.

YOUSEF, Abdullah A.; SHASH, Hwazen A.; ALMAJID, Ali N.; BINAMMAR, Ammar A.; ALMUSABEH, Hamza Ali; ALSHAQAQ, Hassan M.; AL-QAHTANI, Mohammad H.; ALBUALI, Waleed H.. Predictors of Recurrent Acute Chest Syndrome in Pediatric Sickle Cell Disease: a retrospective case-control study. **Children**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 894, 15 jun. 2022.

ZAGO, Marco Antonio e FALCÃO, Roberto Passetto e PASQUINI, Ricardo. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Ed. Atheneu. . Acesso em: 23 jan. 2022.

ZHANG, Xuepu; ZHANG, Yue; YANG, Limin; WU, Yuexin; MA, Xiaohu; TONG, Gang; BAN, Zhaoliang; ZHAO, Haosen. IRF4 suppresses osteogenic differentiation of BM-MSCs by transcriptionally activating miR-636/DOCK9 axis. **Clinics**, [S.L.], v. 77, p. 100019, jan. 2022.

ZHU, Huanhuan; ZHOU, Xiang. Statistical methods for SNP heritability estimation and partition: a review. **Computational And Structural Biotechnology Journal**, [S.L.], v. 18, p. 1557-1568, 2020.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “avaliação do SNP rs12203592 como um biomarcador de gravidade em pacientes com anemia falciforme”, que tem como objetivo principal associar o polimorfismo no gene de IRF4 com biomarcadores de hemólise, inflamação, renais e hepáticos e com manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme. A participação do(a) senhor(a) na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material. Para tanto, necessitamos que o Sr.(a) autorize a obtenção de 2 (duas) amostras de sangue para que a pesquisa seja realizada. As coletas das amostras serão realizadas no ambulatório do centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Ceará (HEMOCE). A participação na pesquisa, não irá lhe expor a nenhum risco que possa comprometer a sua saúde, havendo apenas a possibilidade de formação de uma pequena mancha roxa devido à coleta do sangue. O senhor(a) pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes. Será, no entanto, permitido o acesso às informações sobre procedimentos relacionados à pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal pesquisador é a Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, que reside na rua Pereira Valente, 640, apto 701, bairro Meireles, Fortaleza, CE. Fone: (0xx85) -33668264.

Se o Senhor(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do HUWC- Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 - Rodolfo Teófilo; Fone: (0xx)85 3101.2293- E-mail: cep@hemoce.ce.gov.br

Caso o Senhor (a) se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se o Senhor(a) concordar em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

Assinatura do paciente/ representante legal Data: / /

Assinatura do responsável pelo estudo Data: / /

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CENTRO DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO CEARÁ -
HEMOCE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Polimorfismos em genes de fatores reguladores de interferon em pacientes com anemia falciforme: associação com biomarcadores de inflamação e reguladores do ferro.

Pesquisador: ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 63323722.1.0000.8152

Instituição Proponente: SECRETARIA DA SAUDE DO ESTADO DO CEARA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.185.474

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo do projeto e das Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2168582_E.pdf). Os fatores de transcrição controlam a expressão de conjuntos diversos de genes, atuando como um importante regulador da defesa do hospedeiro por meio das respostas celulares. Eles possibilitam uma rápida alteração e expressão de genes essenciais para combater patógenos extracelulares, sendo também relacionados com o perfil das respostas inflamatórias. A hemólise crônica e a frequência de episódios de vaso-occlusão são determinantes na evolução clínica dos indivíduos com anemia falciforme (AF). Nesse contexto, polimorfismos de nucleotídeo único (IRF-1, IRF-4 e IRF-8) podem causar alterações as respostas inflamatórias, visto que estão associados diretamente com a produção de citocinas inflamatórias. Muitos estudos mostram o papel do IRF-1 e IRF-8 como importante mediador nos processos inflamatórios e relacionados com grande número de doenças, a saber a AF. Por outro lado, o IRF-4 tem papel regulador negativo na resposta, pois induz células Treg e estimulam à produção de IL-4 e IL-10. O estudo proposto é do tipo transversal, descritivo e analítico, no qual um grupo de participantes com anemia falciforme acompanhados no hemocentro entre outubro/22 e julho/23 serão comparados com grupo controle de doadores saudáveis. A análise inclui o pareamento de acordo

Endereço: Av. José Bastos, 3390 4 Rodolfo Teófilo 4 Corredor Administrativo - Sala Prof. Murilo Martins Cidade: F
Bairro: RODOLFO TEÓFILO **CEP:** 60.431-086
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3101-2273 **E-mail:** cep@hemoce.ce.gov.br