



UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

João Victor de Melo Cândido

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE VCAM-1 E SUA CORRELAÇÃO COM OS
BIOMARCADORES DE HEMÓLISE EM PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME**

FORTALEZA

2022

JOÃO VICTOR DE MELO CÂNDIDO

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE VCAM-1 E SUA CORRELAÇÃO COM OS
BIOMARCADORES DE HEMÓLISE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
na disciplina de Monografia II para conclusão
do curso de bacharelado em Farmácia da
Universidade Federal do Ceará.

Orientadora: Profa. Dra. Romélia Pinheiro
Gonçalves Lemes

FORTALEZA

2022

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)

D32a de Melo Cândido, João Victor.
AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE VCAM-1 E SUA CORRELAÇÃO COM OS BIOMARCADORES DE
HEMÓLISE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME / João Victor de Melo Cândido. – 2022.
35 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,
Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

1. Anemia falciforme. 2. VCAM-1. 3. Hemólise. 4. biomarcadores. I. Título.

CDD 615

João Victor de Melo Cândido

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE VCAM-1 E SUA CORRELAÇÃO COM OS
BIOMARCADORES DE HEMÓLISE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
na disciplina de Monografia II para conclusão
do curso de bacharelado em Farmácia da
Universidade Federal do Ceará.

Aprovada em: 21/11/2022

BANCA EXAMINADORA

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

Me. Pedro Aureo Maia Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Lívia Gurgel do Amaral Valente Sá
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais João e Lucilane por me proporcionarem as condições e meios para concluir todos os meus projetos. Aos meus familiares que também contribuíram para minha formação. E a Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, pela excelente orientação.

Aos professores participantes da banca examinadora Dra. Livia Gurgel do Amaral Valente Sá e Dr. Pedro Aureo Maia Filho pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

RESUMO

Portadores de anemia falciforme(AF) apresentam como principal manifestação clínica a vaso-occlusão, que ocorre através da adesão de hemácias com hemoglobina S(HbS) em estado polimerizado e células do sistema imune à parede vascular. Esses eritrócitos atuam como um componente promotor ou iniciador deste fenômeno, ligando-se as células endoteliais vasculares via complexos de integrinas (VLA-4). Além disso, esses eritrócitos e a vaso-occlusão induzem, conseqüentemente, o aumento significativo na expressão do gene codificador da VCAM-1 (molécula-1 de adesão da célula vascular), que liga-se a VLA-4 e induz a fixação ao endotélio com conseqüente oclusão vascular, sendo que essa manifestação é retro-alimentada pela elevação dos níveis de citocinas pró inflamatórias a nível vascular e redução da concentração de óxido nítrico (NO). O objetivo do trabalho foi avaliar os níveis séricos de VCAM-1 em 72 pacientes com AF maiores de 18 anos de idade (idade média de 34,98 anos \pm 10,27) de ambos os sexos e sua correlação com níveis de HbF, uso de hidroxiureia (HU) e marcadores de hemólise (grau de anemia, LDH, bilirrubinas e contagem de reticulócitos). Os pacientes participantes tinham diagnóstico confirmado de AF por eletroforese de Hb e/ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), desses 50 usavam HU. O grupo controle era formado por 34 indivíduos de ambos os sexos maiores de 18 anos de idade doadores de sangue com genótipo HbAA. Os dados sócio-epidemiológicos e laboratoriais foram obtidos dos prontuários médicos. A dosagem dos níveis séricos de VCAM-1 foi realizada a partir de amostra de sangue periférico coletada em tubo de gel separador, e a quantificação foi feita através da técnica de ELISA. A análise estatística ocorreu por meio do uso dos programas IBM SPSS versão 23 e GraphpadPrism versão 6.0. Os testes estatísticos utilizados foram: teste T não pareado, correlação de Pearson, curva ROC e teste qui-quadrado. O valor de corte de p para rejeição da hipótese nula foi de 0,05 (5%). Foi estabelecido, após a comparação, que os níveis séricos de VCAM-1 foram significativamente maiores nos pacientes com AF do que nos indivíduos do grupo controle. Na análise de correlação entre os níveis séricos de VCAM-1 e os parâmetros de hemólise de pacientes com AF todos os biomarcadores de hemólise, com exceção da contagem de reticulócitos, apresentaram correlação estatisticamente significativa. Na análise de correlação para os níveis séricos de VCAM-1 com valores de hemoglobina fetal (HbF) em portadores de AF não foi observada correlação estatisticamente significativa. Na análise realizada para comparação dos níveis séricos da molécula com a presença ou ausência de anemia grave foi obtido que pacientes com AF em estado de anemia grave possuíam níveis séricos mais elevados de VCAM-1. Na comparação dos níveis séricos de VCAM-1 entre pacientes que utilizavam e os que não faziam uso de hidroxiureia(HU) não houve diferença estatisticamente significativa. Concluiu-se que os dados demonstram que o VCAM-1 é promissor como biomarcador preditivo para o grau de anemia e do quadro de hemólise.

Palavras-chave: anemia falciforme; VCAM-1; hemólise; biomarcadores.

ABSTRACT

Patients with sickle cell anemia (SCA) present vaso-occlusion as their main clinical manifestation, which occurs through adhesion of red blood cells with hemoglobin S (HbS) in a polymerized state and cells of the immune system to the vascular wall. These erythrocytes act as a promoter or initiator component of this phenomenon, binding to vascular endothelial cells via integrin complexes (VLA-4). In addition, these erythrocytes and vaso-occlusion consequently induce a significant increase in the expression of the gene encoding VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), which binds to VLA-4 and induces attachment to the endothelium with consequent vascular occlusion, and this manifestation is fed back by the elevation of the levels of pro-inflammatory cytokines at the vascular level and the reduction of the concentration of nitric oxide (NO). patients with SCA over 18 years of age (mean age 34.98 years \pm 10.27) of both genders and their correlation with HbF levels, hydroxyurea (HU) use and hemolysis markers (degree of anemia, LDH , bilirubin and reticulocyte count). The participating patients had a confirmed diagnosis of AF by Hb electrophoresis and/or high performance liquid chromatography (HPLC), of which 50 used HU. The control group consisted of 34 individuals of both sexes over 18 years of age who were blood donors with the HbAA genotype. Socio-epidemiological and laboratory data were obtained from medical records. VCAM-1 serum levels were measured using a peripheral blood sample collected in a separator gel tube, and quantification was performed using the ELISA technique. Statistical analysis was performed using IBM SPSS version 23 and GraphpadPrism version 6.0 programs. The statistical tests used were: unpaired t test, Pearson's correlation, ROC curve and chi-square test. The p cut-off value for rejecting the null hypothesis was 0.05 (5%). It was established, after comparison, that serum levels of VCAM-1 were significantly higher in patients with SCA than in subjects in the control group. In the correlation analysis between VCAM-1 serum levels and hemolysis parameters in patients with SCA, all hemolysis biomarkers, with the exception of reticulocyte count, showed a statistically significant correlation. In the analysis of correlation between VCAM-1 serum levels and fetal hemoglobin (HbF) values in patients with SCA, no statistically significant correlation was observed. In the analysis carried out to compare the serum levels of the molecule with the presence or absence of severe anemia, it was found that patients with SCA in a state of severe anemia had higher serum levels of VCAM-1. When comparing VCAM-1 serum levels between patients who used and those who did not use hydroxyurea (HU), there was no statistically significant difference. It was concluded that the data demonstrate that VCAM-1 is promising as a predictive biomarker for the degree of anemia and hemolysis.

Keywords: sickle cell anemia; VCAM-1; hemolysis; biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquematização do processo de falcização das hemácias com hemoglobina..... 14
- Figura 2 – Processo de adesão eritrocitária, induzido pela falcização das hemácias, exacerbado pela redução da concentração de NO₂ vascular e expressão elevada de moléculas de adesão como VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina..... 16

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparação dos níveis de VCAM-1 entre pacientes e grupo controle.....	23
Gráfico 2 – Curva ROC para determinação da acurácia do VCAM-1 em diferenciar pacientes do controle.....	23
Gráfico 3 – Correlação de Pearson para os valores de VCAM-1 e contagem de reticulócitos.....	24
Gráfico 4 – Correlação de Pearson para os níveis de VCAM-1 e valores de LDH.....	25
Gráfico 5 – Correlação de Pearson para os níveis de VCAM-1 e bilirrubina direta.....	27
Gráfico 6 – Correlação entre os valores das dosagens de VCAM-1 e bilirrubina indireta.....	28
Gráfico 7 – Correlação entre os níveis de VCAM-1 e bilirrubina total.....	28
Gráfico 8 – Correlação entre VCAM-1 e hemoglobina fetal ($p > 0,05$).....	29
Gráfico 9 – Curva ROC para determinação da acurácia da comparação dos níveis de VCAM-1 em pacientes com AF em uso ou não de HU com os parâmetros de hemólise.....	29
Gráfico 10 – Comparação obtida após submeter os valores de VCAM-1 de pacientes que apresentaram anemia grave e que não apresentaram ao teste T.....	30
Gráfico 11 – Comparação dos níveis de VCAM-1 em pacientes em uso de hidroxiureia e em pacientes que não utilizavam.....	31
Gráfico 12 – Curva ROC de acurácia da correlação entre VCAM-1 e o uso de hidroxiureia.....	31
Gráfico 13 – segmentação por quartis dos pacientes segundo o uso de hidroxiureia, com comparação dos valores de VCAM-1 entre o primeiro quartil e o segundo, terceiro e quarto agrupados.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios dos marcadores de hemólise dos pacientes com AF.....	22
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia falciforme
CVO	Crise vaso oclusiva
DF	Doença falciforme
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbS	Hemoglobina S
HbF	Hemoglobina fetal
HU	Hidroxiureia
LDH	Lactato desidrogenase
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Definição	12
1.2 Epidemiologia	12
1.3 Fisiopatologia.....	13
1.4 VCAM-1.....	15
1.5 Inflamação	16
1.6 Hemoglobina fetal	16
1.7 Biomarcadores de hemólise.....	17
1.8 Tratamento	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.1.1 Objetivos específicos.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Tipo do Estudo.....	19
3.2 Considerações Éticas	19
3.3 Casuística.....	20
3.4 Critérios de Inclusão	20
3.5 Critérios de exclusão	20
3.6 Coleta de dados.....	20
3.7 Análise estatística.....	21
3.8 Estratificação da amostra	21
4 RESULTADOS	21
5 DISCUSSÕES	30
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição

Doença falciforme (DF) é um termo que refere-se a um grupo de hemoglobinopatias hereditárias resultantes de um distúrbio morfofisiológico da hemoglobina (Hb), uma metaloproteína presente nos eritrócitos que permite o transporte de gases à nível celular e vascular. Dentre os tipos de DF, a composição genética de maior impacto clínico é a anemia falciforme (AF), condição em que o gene gerador da hemoglobina S (HbS) é herdado de ambos os pais e culmina na forma homozigótica da HbSS (MOTA *et al.*, 2022).

1.2 Epidemiologia

Em 1910, a doença falciforme foi descoberta pela genética clássica, com a contribuição do médico James Herrick, em Chicago. Esta foi a primeira doença molecular humana encontrada no sangue de um estudante negro, nascido nas Antilhas, que apresentava anemia grave, fortes dores nas articulações e icterícia. A doença falciforme representa a enfermidade hereditária mais prevalente no mundo, tornando-se mais importante em nosso país após o fenômeno de miscigenação com a introdução de populações do continente africano proveniente do comércio de escravos (ARAÚJO *et al.*, 2014). O Brasil possui de 0,1% a 0,3% da população vivendo com AF, sendo prevalente nas regiões sudeste e nordeste do país. Segundo o ministério da saúde, esse número pode chegar de 25 a 30 mil, e ainda outras estimativas mostram que esse número pode aumentar em até 3.500 novos casos por ano (MACHADO *et al.*, 2018).

Na região Nordeste, foi descrita a frequência de 0,2% para a AF em 1.988 recém-nascidos no estado de Pernambuco; em Natal, Rio Grande do Norte, foi encontrada frequência de 0,05% de portadores da AF. No estado da Bahia a frequência foi de 0,2% de portadores da anemia falciforme em recém-nascidos de uma maternidade pública da cidade de Salvador-BA. Em Fortaleza, houve a prevalência de 4,1% de portadores de HbS em 389 amostras de recém nascidos(LILIANNE, 2022).

1.3 Fisiopatologia

A substituição de um único nucleotídeo levando a uma troca de um resíduo de ácido glutâmico por valina na cadeia β globina transforma a hemoglobina normal em uma hemoglobina estruturalmente anormal, denominada hemoglobina S (HbS), que causa DF e está associada à ativação do endotélio e inflamação. A consequência molecular principal da AF é a polimerização da desoxiemoglobina S por exposição a baixos níveis de oxigênio, havendo a deformação da membrana das hemácias, que se tornam alongadas no formato típico de foice (drepanócitos), mais aderentes às células endoteliais e menos flexíveis (FIGUEIRA *et al.*, 2022).

Todas essas alterações da hemoglobina e consequentemente das hemácias na AF diminuem a capacidade da permeabilidade celular. A contínua alteração da morfologia dos eritrócitos com HbS provoca lesões crônicas da membrana celular, a ponto do eritrócito tornar-se irreversivelmente falcizado, acentuando as complicações não só em nível celular como também em circulatório. Dentre as alterações da membrana temos os seguintes eventos: rearranjo das proteínas espectrina-actina, diminuição de glicoproteínas, geração de radicais livres, externalização da fosfatidilserina e aceleração da apoptose, devido ao aumento da atividade citosólica de cálcio (Ca^{2+}). A alteração celular causada pelo processo de falcização influencia intensamente o fluxo sanguíneo, aumentando a sua viscosidade. Os eritrócitos falciformes irreversíveis têm capacidade aumentada de adesão ao endotélio vascular, principalmente, devido à alta viscosidade do sangue e também pela elevação dos níveis de fibrinogênio, que ocorre como resposta natural à infecções (MANFREDINI *et al.*, 2014). Na figura 1 há a esquematização de como a troca dos resíduos de aminoácidos provoca a doença e sua principal consequência, a formação de drepanócitos.

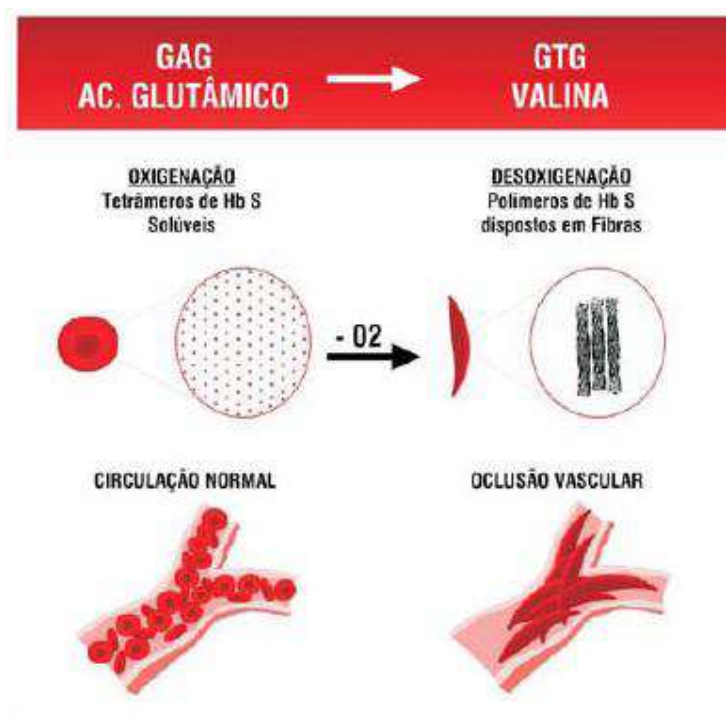


Figura 1: esquematização do processo de falcização das hemácias com hemoglobina S (HbS) em condições de pouca oxigenação, mostrando a diferença de disposição da hemoglobina que provoca alteração na solubilidade causando o fenômeno de oclusão vascular por adesão das hemácias ao endotélio. Fonte: LOBO, C.; MARRA, V. N.; SILVA, R. M. G. 2007.

Os eritrócitos falciformes expressam maior número de moléculas de adesão na superfície externa da membrana celular do que eritrócitos normais. Essas moléculas favorecem a interação com o endotélio e com outras células, causando o processo de vaso oclusão, algumas dessas moléculas estão presentes apenas nos eritrócitos. As hemácias que não circulam adequadamente na micro circulação, acabam provocando uma obstrução do fluxo sanguíneo capilar ou são destruídas precocemente, como acontece no momento em que essas células encontram-se no baço, onde as condições de circulação facilitam a falcização provocando repetidos infartos que levam à fibrose e destruição do órgão na maioria dos pacientes (esplenectomia). Como consequência do grande número de eritrócitos alterados ocorrerá redução da luz dos capilares, provocando estase, que pode se intensificar com a diminuição da temperatura do ambiente ocorrendo hipóxia tecidual, levando mais moléculas de hemoglobina S no estado desoxigenado, piorando a situação circulatória e lesionando os tecidos e causando infartos com necrose e formação de fibrose, principalmente no baço,

medula óssea e placenta. Esses eventos podem causar lesões tissulares agudas, com crises dolorosas cronicadas (SOUZA, 2016).

1.4 VCAM-1

Atualmente, tem sido demonstrado que os eritrócitos de portadores de anemia falciforme têm um papel principal nos processos de vaso-oclusão, sendo um componente promotor ou iniciador destes processos, ligando-se as células endoteliais vasculares via complexos de integrinas (VLA-4). Além disso, esses eritrócitos induzem o aumento significativo na expressão do gene codificador da VCAM-1 (molécula-1 de adesão da célula vascular) (ANTONIO, 2022).

Na AF, a oclusão vascular também é iniciada pela adesão de reticulócitos circulares ao endotélio vascular. Isso leva a uma cascata de crises dolorosas que terminam em falência de órgãos. Pelo menos dois receptores, geralmente presentes nos reticulócitos, parecem ser importantes nesse processo de adesão. O CD36 (Glicoproteína IV) está implicado na ligação das hemácias ao revestimento endotelial dos vasos sanguíneos por sua ligação à trombospondina e a molécula-1 de adesão da célula vascular (VCAM-1) que se liga a integrina $\alpha 4\beta 1$ (antígeno de ativação muito tardia 1) presente no eritrócito (DAMANHOURI *et al.*, 2015). A VCAM-1 (CD160) é uma imunoglobulina presente em células endoteliais, epitélio, macrófagos e células dendríticas. Sua expressão é induzida por citocinas e tem como receptor a integrina VLA-4 (antígeno de atividade tardia-4). A VCAM-1 possui duas estruturas alternativas, a maior compreende 7 domínios do tipo imunoglobulina e a menor contém 4 domínios. A ligação da forma maior e, predominantemente, com o VLA-4 requer a presença do domínio 1 e 4, sendo o domínio 2 importante para a conformação da molécula (ANTONIO, 2022).

O aumento na expressão de moléculas de adesão, como VCAM-1, no plasma e em células endoteliais é em parte devido a superexpressão gênica, pela presença de sítios de ligação para o fator de transcrição nuclear NF- κ B. As alterações na modulação de moléculas de adesão endoteliais ocasionam migração e liberação inapropriada dessas moléculas pelos leucócitos, bem como de peróxido de hidrogênio que causam dano tecidual, aumento das interações celulares e como consequência as crises de vaso oclusão (PATHARE *et al.*, 2003). Abaixo, a Figura 2 exhibe o processo de expressão de VCAM-1 mediada pelas citocinas pró inflamatórias e a consequente adesão de eritrócitos e neutrófilos no endotélio vascular em

condições de hipóxia e redução da concentração de óxido nítrico. Esse processo demonstra que a inflamação é um estado frequente em portadores de AF.

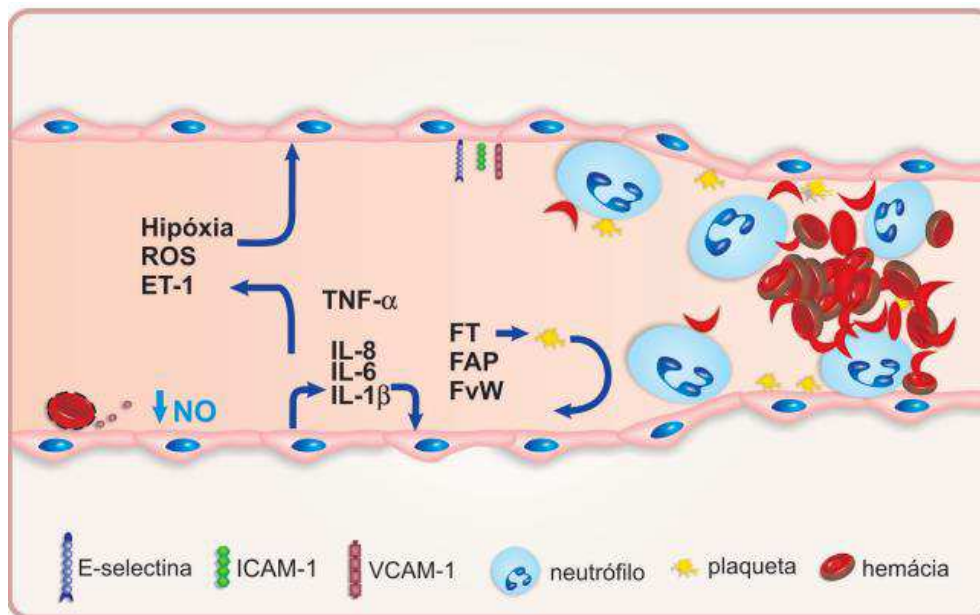


Figura 2: processo de adesão eritrocitária, induzido pela falcização das hemácias, exacerbado pela redução da concentração de NO₂ vascular e expressão elevada de moléculas de adesão como VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina induzidas por citocinas inflamatórias (TNF-alfa, IL-8, IL-6, IL-1beta) liberadas por células endoteliais com aglomeração de neutrófilos na região da inflamação. Fonte: COSTA F. F., *et al.* 2013.

1.5 Inflamação

A inflamação crônica que ocorre nos pacientes com AF é decorrente de diversos fatores que se interligam e se retroalimentam, formando um ciclo inflamatório permanente. A adesão de eritrócitos ao endotélio vascular é o mecanismo primário das alterações moleculares que ocorrem na hemácia e é transmitida aos tecidos, essa adesão pode causar obstrução e hipóxia local, com agravamento da falcização e desencadeando os fenômenos inflamatórios que podem ser intensificados se os tecidos estiverem necrosados, além de redução da disponibilidade de óxido nítrico e liberação de citocinas típicas do processo inflamatório. A vaso constrição retarda o fluxo sanguíneo e favorece a falcização das hemácias falciformes. As células endoteliais passam a liberar endotelina-1, um peptídeo pró-inflamatório e potente vasoconstritor de grandes e pequenas artérias e veias (JANAINA MARTINS SOUZA *et al.*, 2016).

1.6 Hemoglobina fetal

O acompanhamento de pacientes com AF é realizado através da dosagem de biomarcadores e sua respectiva avaliação. Um dos biomarcadores mais úteis para definição de prognóstico em pacientes com AF é a hemoglobina fetal (HbF). A HbF diferencia-se da hemoglobina A devido à sua maior afinidade para ligar-se ao oxigênio. Esse fato faz com que as hemácias com HbF sobrevivam mais que as que apresentam HbS, sendo que quando há níveis elevados de HbF ocorre a interrupção da polimerização da hemoglobina. Além disso, devido à sua incapacidade de entrar na fase de polimerização da HbS, a HbF pode ser considerada o regulador central das características clínicas e hematológicas da DF (DAMANHOURI *et al.*, 2015).

1.7 Biomarcadores de hemólise

A quantificação da hemoglobina em gramas por decilitro de sangue é utilizada para monitorar o grau de anemia dos pacientes com AF. Os valores de hemoglobina encontrados através da realização do hemograma foram utilizados como forma de estabelecimento de critério prognóstico em vários pacientes por ABAN *et al.*, 2017, sendo que para anemia grave considera-se valores abaixo de 8 g/dL de Hb, para anemia moderada os valores devem ficar entre 8 g/dL e 10 g/dL e para anemia leve entre 10 g/dL e 12 g/dL para pacientes com AF.

Ainda no que diz respeito ao acompanhamento com biomarcadores, há os marcadores de hemólise que são utilizados na determinação do controle da progressão da AF e se relacionam com os fenômenos agudos da doença. Os níveis séricos de lactato desidrogenase (LDH) encontram-se elevados em pacientes com AF. Essa enzima está presente no citoplasma de todas as células do organismo, sendo rica nos tecidos cardíaco, hepático, pulmonar e renal, além do músculo esquelético e eritrócitos. Portanto, o LDH está relacionado à morte prematura das hemácias e conseqüentemente com a hemólise (DAMANHOURI *et al.*, 2015; IVONE, 2012).

A anemia falciforme é uma doença com quadro de anemia hemolítica grave, com conseqüente aumento de bilirrubina indireta e elevação do número de reticulócitos na circulação periférica. O aumento desses parâmetros também pode ser utilizado como acompanhamento do quadro hemolítico (ZAGO *et al.*, 2007).

1.8 Tratamento

A respeito do tratamento para pacientes com AF, após vários estudos com a HU ficou evidente, nos pacientes que a utilizam, um aumento significativo nos níveis de HbF.

Levando em consideração que a HbF tem um efeito protetor em pacientes com AF foi sugerido o seu uso para pacientes com essa enfermidade, sendo comprovado anos depois através de estudos bioquímicos e clínicos a sua eficácia. E em 1998, a HU passou a fazer parte dos medicamentos prescritos para AF, em 2002 através da portaria de N° 872 do Ministério da Saúde, lei aprovada para pacientes com AF no Brasil, sendo que ficou expresso nessa portaria que as Secretarias de Saúde dos Estados da União e Distrito Federal, ficaram responsáveis pela distribuição e dispensação da HU (QUIRINO, 2022).

Há nos dias atuais, outra forma de tratamento para pacientes com AF. O Adakveo® é o primeiro fármaco registrado que atua para evitar a obstrução dos vasos que causam o forte sintoma. A substância atua agindo na P-selectina, proteína de adesão celular que desempenha papel central nas interações multicelulares. O registro de Adakveo® (crizanlizumabe) foi aprovado no Brasil. O medicamento da Novartis é indicado para reduzir a frequência de crises vaso-oclusivas (CVOs) ou crises de dor em pacientes com doença falciforme para pacientes acima de 16 anos. Através do estudo multicêntrico randomizado SUSTAIN, foi observado que o medicamento reduziu a média anual das crises de dor dos pacientes com doença falciforme em 45,3% se comparadas ao placebo (1,63 vs 2,98) e diminui a média anual de dias hospitalizado (4 vs 6,87), conforme estudo realizado durante 52 semanas (NEVES; NEVES, 2020).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como meta contribuir para verificar a possível correlação entre os níveis séricos de VCAM-1 e biomarcadores de hemólise uso frequente em pacientes com anemia falciforme. Além disso, o trabalho irá contribuir com o desenvolvimento de linhas de pesquisa na área de biomarcadores de prognóstico nos pacientes com AF. Devido a nova linha de tratamento da doença possuir relação com moléculas de adesão, logo, e analisar tais moléculas pode contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos atuais dos medicamentos inovadores destinados a tratar pessoas com AF e seu prováveis benefícios, além contribuir para o entendimento entre níveis de VCAM-1 e quadros clínicos recorrentes (quadro hemolítico intenso e estado inflamatório crônico).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis séricos de VCAM-1 e sua correlação com os biomarcadores de hemólise, hemoglobina fetal e uso de hidroxiureia em pacientes com anemia falciforme.

2.1.1 Objetivos específicos

- Determinar os níveis séricos de VCAM-1 nos pacientes com AF e comparar com o grupo controle;
- avaliar a correlação entre os níveis séricos de VCAM-1, biomarcadores de hemólise e HbF;
- avaliar a comparação entre os níveis séricos de VCAM-1 em pacientes com AF usuários e não usuários de HU.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipo do Estudo

Trata-se de um estudo transversal, descritivo e analítico, consistindo na avaliação dos níveis de VCAM-1 em pacientes adultos com diagnóstico clínico e laboratorial de AF, em acompanhamento ambulatorial no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), no período de fevereiro de 2018 a março de 2019.

3.2 Considerações Éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o nº de protocolo 3.066.321, pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), protocolo 3.190.166e pelo Comitê de Ética do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) sob o nº de protocolo 3.229.549. O trabalho foi executado segundo os princípios e normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 466/2012.

3.3 Casuística

Participaram do estudo 72 pacientes maiores de 18 anos de idade, de ambos os sexos, com diagnóstico confirmado de AF por eletroforese de hemoglobina e/ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), desses 50 faziam uso de hidroxiureia e 22 não utilizavam. O grupo controle foi formado por 34 indivíduos maiores de 18 anos de idade, de ambos os sexos, doadores de sangue (HbAA) do HEMOCE.

3.4 Critérios de Inclusão

Pacientes portadores de AF maiores de 18 anos de idade de ambos os sexos em uso ou não de hidroxiureia. Os participantes do estudo apresentavam-se no estado basal da doença, segundo os critérios estabelecidos por Ballas (2012): ausência de crises dolorosas por quatro semanas consecutivas; nenhuma admissão hospitalar nos últimos 2-3 dias; histórico negativo de transfusão sanguínea durante os 4 meses anteriores; nenhuma intercorrência de infecção ou inflamação nas últimas 4 semanas; nenhum tratamento com medicamentos que possam afetar o hemograma (antibióticos, imunossupressores, entre outros) durante as últimas 3 semanas (BALLAS, 2012). Para o grupo controle os critérios de inclusão eram: apresentar genótipo (HbAA), ser maior de 18 anos de idade e de ambos os sexos.

3.5 Critérios de exclusão

Pacientes com AF que apresentavam diabetes, tabagismo, estavam gestantes, etilismo ou com sorologia positiva para hepatites B e C ou HIV. No grupo controle foram excluídos os indivíduos diabéticos, gestantes, tabagistas, etilistas e com sorologia positiva para hepatites B e C ou HIV.

3.6 Coleta de dados

Os dados sócio-epidemiológicos e laboratoriais (concentração de HbF, concentração de hemoglobina, LDH, contagem de reticulócitos, bilirrubinas (direta, indireta e total) e informações sobre a utilização de HU foram obtidos dos prontuários médicos. A dosagem dos níveis de VCAM-1 foi realizada a partir de amostra de sangue periférico coletada em tubo de gel separador. A quantificação de VCAM-1 foi realizada através da técnica ELISA (enzyme-linkedimmunosorbentassay) sanduíche utilizando um kit de teste comercial da Abcam®. Para a leitura colorimétrica foi utilizado o espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm.

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do uso dos programas IBM SPSS versão 23 e GraphpadPrism versão 6.0. Os testes estatísticos utilizados foram: teste T não pareado, correlação de Pearson, curva ROC (receiveroperatorcharacteristic curve) e teste qui-quadrado. O valor de corte de p para rejeição da hipótese nula foi de 0,05 (5%) (FERREIRA; PATINO, 2015).

3.8 Estratificação da amostra

O grupo dos 72 pacientes foi estratificando segundo o grau de anemia em pacientes com anemia grave ($Hb < 8g/dL$), com anemia moderada ($Hb = 8g/dL$ à $10g/dL$) e com anemia leve ($Hb = 10g/dL$ à $12g/dL$) (ABAN *et al.*, 2017). Além de serem estratificados segundo o uso ou não de hidroxiureia.

4 RESULTADOS

4.1 Perfil etário da amostra e parâmetros obtidos de prontuários

Foram incluídos 72 pacientes e 34 controles. Dos pacientes, 32 do sexo masculino, 40 do sexo feminino. A idade média era de 34,98 anos \pm 10,27, com valores variando entre 20 e 66 anos. Dos pacientes, 50 faziam uso de hidroxiureia e 22 não utilizavam. Quanto à classificação da anemia, 15 foram agrupados como apresentando anemia grave (ABAN et al., 2017). A hemoglobina fetal dos pacientes teve média 13,55 \pm 6,19 g/dL.

A tabela abaixo expõe os valores médios dos biomarcadores utilizados na avaliação de hemólise, sendo eles contagem de reticulócitos, de lactato desidrogenase, bilirrubinas (direta, indireta e total). Também é possível visualizar na tabela a quantidade de pacientes com os parâmetros elevados acima dos valores de referência obtidos da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC/ML - Home, 2022).

Parâmetro	Média	EPM	Referência	N aumentado	N normal
Reticulócitos (/mm ³)	2209656	75332	20.000 a 80.000	70	2
Lactato desidrogenase (U/L)	848,18	317,83	230 a 460	67	5
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,46	0,26	Até 0,4	35	37
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	2,64	2,29	Até 0,8	67	5
Bilirrubina Total (mg/dL)	3,11	2,36	Até 1,2	65	7

Tabela 1: valores médios dos marcadores de hemólise dos pacientes com AF. Fonte: autoria própria.

4.2 Níveis séricos de VCAM-1 em pacientes e grupo controle

A comparação dos níveis séricos de VCAM-1 dos pacientes com os controles estabelecidos através do Teste T não pareado está apresentada abaixo no gráfico 1. Com o valor de p foi menor que 0,05 (5%). A Média e desvio padrão dos valores do parâmetro para o grupo com AF foi de 1748 (ng/mL) \pm 105,2 (ng/mL) e para o grupo controle foi 938,1 (ng/mL) \pm 80 (ng/mL). Isso demonstrou a diferença estatística relevante entre os

níveis séricos da molécula de adesão de indivíduos com AF e grupo controle. Infere-se que ocorreu níveis séricos mais elevados justamente no grupo com a doença.

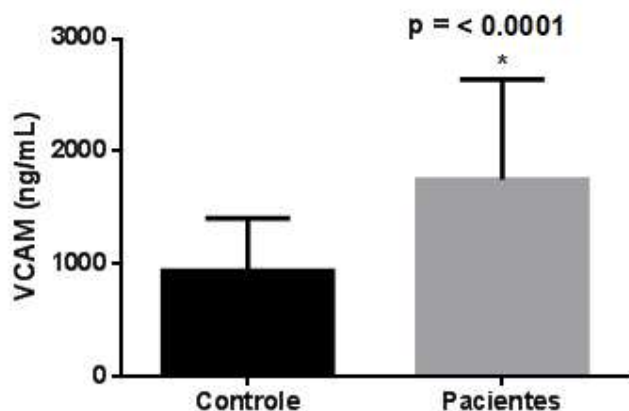


Gráfico 1: comparação dos níveis de VCAM-1 entre pacientes e grupo controle, onde o grupo controle apresentou níveis menos elevados. Fonte: autoria própria.

Foi traçada uma curva ROC (receiveroperatorcharacteristic curve) a fim de verificar a correlação do VCAM-1 com a diferenciação entre pacientes e grupo controle, o que revelou uma acurácia de 84,68%, indicando que este parâmetro realmente tende a estar elevado em pacientes com anemia falciforme.

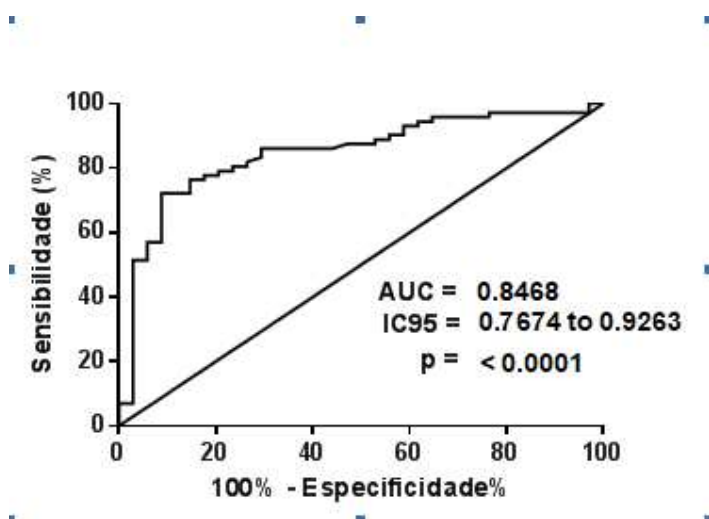


Gráfico 2: curva ROC para determinação da acurácia do VCAM em diferenciar pacientes do controle. Fonte: autoria própria.

4.3 Correlação dos níveis séricos de VCAM-1 e biomarcadores de hemólise

Na análise de correlação entre o VCAM e os parâmetros de hemólise, por correlação de Pearson, todos os parâmetros, com exceção da contagem de reticulócitos, mostraram correlações positivas, estatisticamente significantes ($p < 0,05$). No gráfico 3 pode-se visualizar que não foi obtida correlação estatisticamente significativa entre os valores de VCAM-1 dos portadores de AF em uso e sem uso de HU e os valores de contagem de reticulócitos.

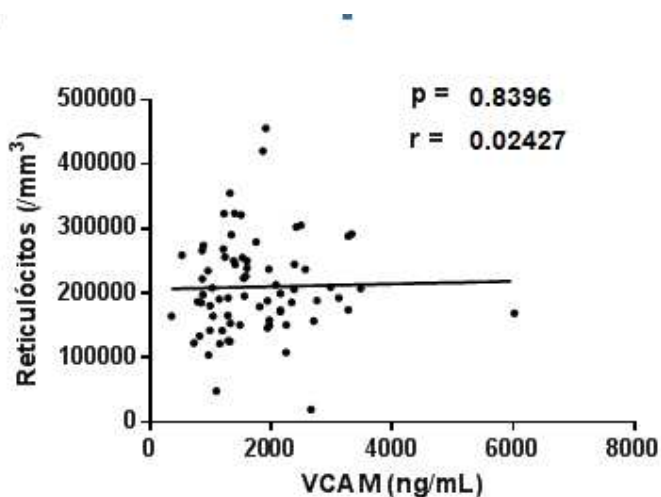


Gráfico 3: correlação de Pearson para os valores de VCAM-1 e contagem de reticulócitos. Com o valor de $p > 0,05$ a hipótese de correlação entre os níveis de VCAM-1 e reticulócitos perde significância. Fonte: autoria própria.

No gráfico 4, o teste de correlação de Pearson apresentou resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$), ou seja, houve relação estatística entre as duas variáveis. Os valores de LDH e VCAM-1 utilizados na análise são referentes aos de pacientes com AF com e sem uso de HU.

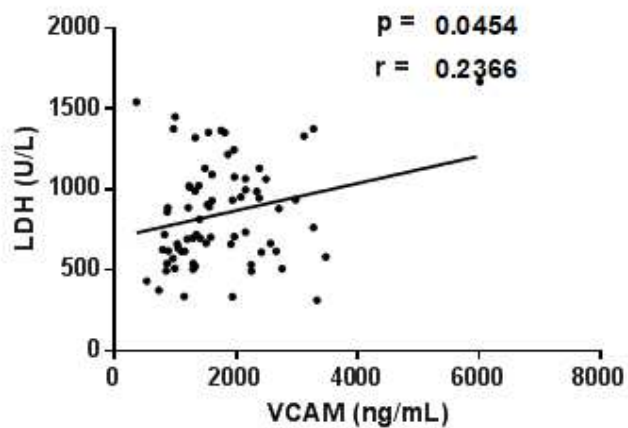


Gráfico 4: correlação de Pearson para os níveis de VCAM-1 e valores de LDH. Fonte: autoria própria.

Nos gráficos 5, 6 e 7, o teste de correlação de Pearson apresentou resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$), revelando relação estatística significativa entre os valores de bilirrubinas direta, indireta e total, respectivamente, com os níveis séricos de VCAM-1.

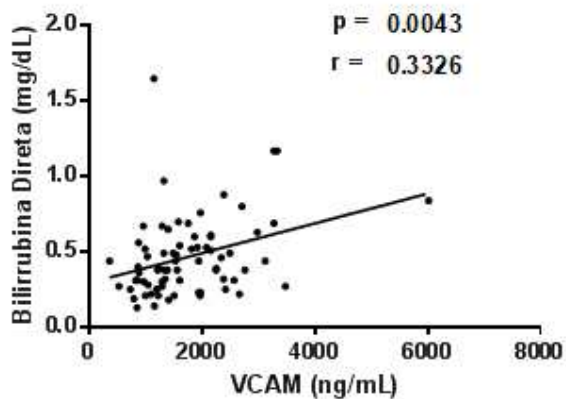


Gráfico 5: correlação de Pearson para os níveis de VCAM-1 e bilirrubina direta. Fonte: autoria própria.

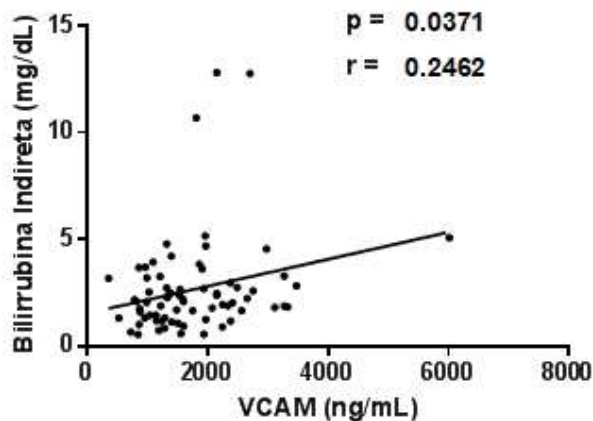


Gráfico 6: correlação entre os valores das dosagens de VCAM-1 e bilirrubina indireta. Fonte: autoria própria.

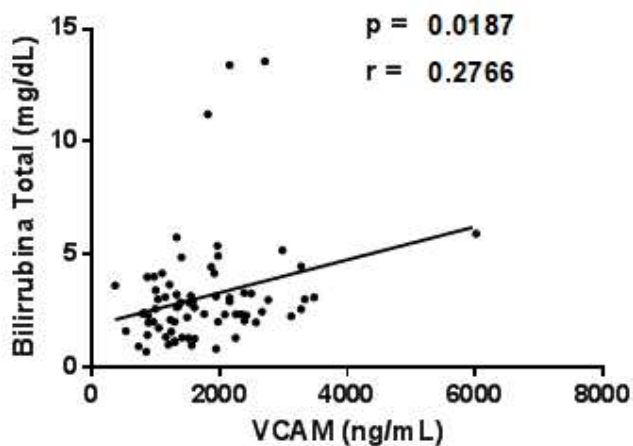


Gráfico 7: correlação entre níveis de VCAM-1 e bilirrubina total. Fonte: autoria própria.

4.4 Correlação de Pearson para níveis de VCAM-1 e HbF

A análise de correlação de Pearson também foi realizada para HbF, porém não houve correlação estatisticamente significativa, como foi evidenciado pelo valor de $p > 0,05$. A hemoglobina fetal dos pacientes com AF em uso ou não de HU teve média $13,55 \pm 6,19$ g/dL.

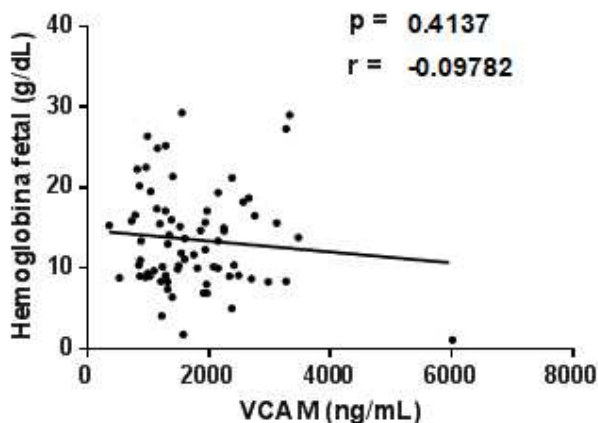


Gráfico 8: correlação entre VCAM-1 e hemoglobina fetal ($p > 0,05$).Fonte: autoria própria.

Dessa forma, foi perceptível que a hemólise tem uma influência sobre a liberação de VCAM-1 com conseqüente redução de NO e possível indicação de aumento na presença de citocinas pró-inflamatórias na circulação. A bilirrubina direta apresentou o seguinte perfil com uma divisão praticamente igualitária de indivíduos com valores aumentados e normais, comparou-se o VCAM, percebendo-se que havia diferença (Teste T não pareado) e foi feita uma curva ROC, concluindo que a hemólise, de fato, exerce efeito sobre a liberação desse marcador presente no endotélio.

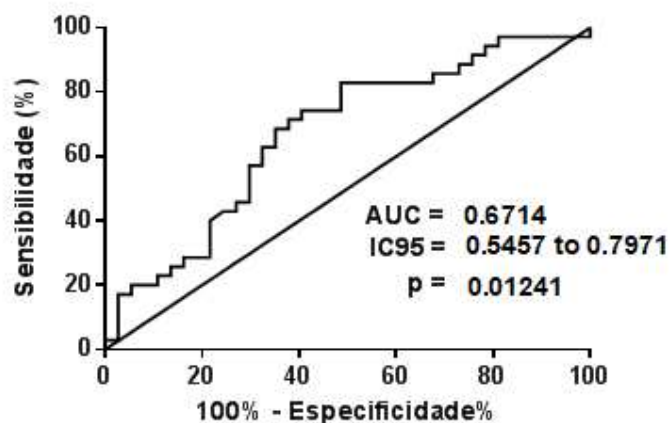


Gráfico 9: curva ROC para determinação da acurácia da comparação dos níveis de VCAM-1 em pacientes com AF em uso ou não de HU com os parâmetros de hemólise. Fonte: autoria própria.

4.5 Teste T para comparação entre níveis de VCAM-1 e paciente com ou sem anemia grave

O teste T foi aplicado também a fim de verificar se havia diferença nos níveis de VCAM entre os pacientes que apresentavam anemia grave e os que não possuíam esse grau de anemia. Os pacientes com anemia grave apresentavam níveis de VCAM mais altos e a comparação foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Valores médios e desvio padrão de VCAM-1 para pacientes com anemia grave e sem anemia grave, respectivamente: $2165 \text{ (ng/dL)} \pm 329$ e $1639 \text{ (ng/dL)} \pm 97,84$.



Gráfico 10: comparação obtida após submeter os valores de VCAM-1 de pacientes que apresentaram anemia grave e que não apresentaram ao teste T. Fonte: autoria própria.

4.6 Teste T para comparação entre níveis de VCAM-1 em pacientes em uso ou não de HU

A mesma comparação foi feita com relação ao uso da HU (gráfico 12), ou seja foram comparados os valores de VCAM-1 entre pacientes que utilizavam o medicamento e os valores para pacientes que não faziam uso, o que revelou que o uso ou não de HU não causou diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos de VCAM-1 ($p > 0,05$).

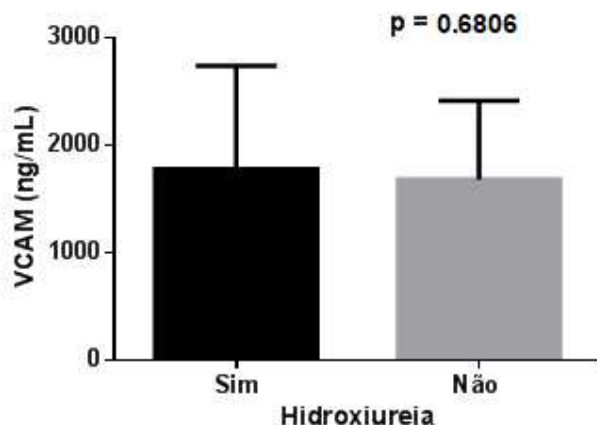


Gráfico 11: comparação entre os níveis de VCAM-1 em pacientes em uso de hidroxiureia e em pacientes que não utilizavam. Média e desvio padrão para portadores de AF em uso de HU: $1777 \pm 135,9$. Média e desvio padrão para portadores de AF que não usavam HU: $1682 \pm 155,9$. Fonte: autoria própria.

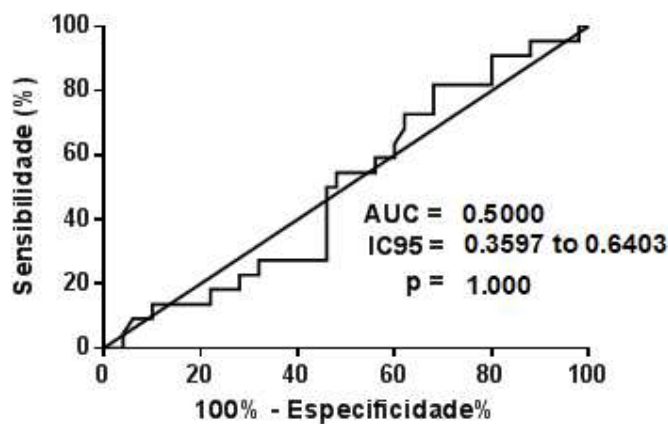


Gráfico 12: curva ROC de acurácia da correlação entre VCAM-1 e o uso de hidroxiureia. Fonte: autoria própria.

O teste do qui-quadrado confirmou este achado. Os 72 pacientes foram divididos em quartis. O primeiro quartil continha os 18 pacientes com valores mais baixos de VCAM, o segundo com os 18 seguintes, assim sucessivamente. Em seguida, o primeiro quartil foi comparado com um grupo formado pelos outros quartis (2º ao 4º), o que mostrou que não havia diferença na proporção de indivíduos que faziam uso de hidroxiureia entre os grupos.

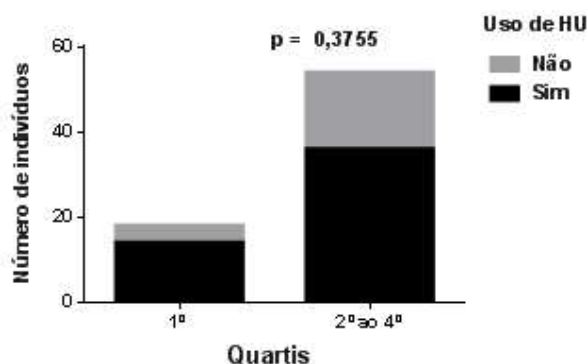


Gráfico 13: segmentação por quartis dos pacientes segundo o uso de hidroxiureia, com comparação dos valores de VCAM-1 entre o primeiro quartil e o segundo, terceiro e quarto agrupados. Fonte: autoria própria.

5 DISCUSSÕES

A respeito da comparação dos níveis de séricos VCAM-1 entre os grupos controle e pacientes foi observado que ocorreram valores mais elevados entre os pacientes, houve significância para a hipótese alternativa (diferença dos níveis de VCAM-1 entre pacientes e controles). Isso contribui para a hipótese de uso da dosagem de nível sérico do VCAM-1 para acompanhamento do perfil inflamatório das pessoas com AF. Este achado é semelhante ao demonstrado por DUITIS *et al.*, 1996 que em seu trabalho analisou os níveis séricos de VCAM-1 em 10 pacientes maiores de 18 anos de idade (idade média de 39 anos) e comparou com os níveis séricos em 20 indivíduos do grupo controle (HbAA) adultos com idade média de 42 anos e observou valores aumentados de VCAM-1 solúvel no grupo com AF em relação aos valores do grupo controle.

Como relatado anteriormente no presente estudo, a contagem de reticulócitos não apresentou correlação positiva com os níveis séricos de VCAM-1. Esse achado divergente do encontrado na literatura pode ter ocorrido por conta do agrupamento dos valores de contagem de reticulócitos sem levar em consideração o grau de hemólise de pacientes que não

utilizavam hidroxiureia, além da interferência durante a coleta de dados nos prontuários, que era realizada em momentos posteriores com intervalo de tempo elevado com relação ao período em que foi feita a coleta da amostra de sangue. Por essas prováveis justificativas os resultados encontrados diferem dos obtidos por WHITE *et al.*, 2020 avaliou a quantidade de VCAM-1 expressa pelo endotélio através da adesão dos eritrócitos em 47 pacientes com AF em estado estacionário com idade superior a 18 anos e o coeficiente de adesão utilizado foi comparado com a contagem de reticulócitos dos indivíduos da amostra e foi obtida uma correlação positiva que demonstra a relação entre aumento da adesão eritrocitária, quantidade de reticulócitos na circulação periférica e quantidade provável de VCAM-1 relacionada à adesão.

Na análise dos valores de VCAM-1 com o parâmetro de hemólise LDH foi obtida uma correlação significativa, os pacientes com maiores níveis de LDH apresentaram valores maiores de VCAM-1. Isso evidencia o aumento da hemólise relacionada a maior adesão dos eritrócitos na parede vascular de vasos de órgãos e tecidos, corroborando a correlação entre o nível sérico do VCAM-1 com LDH e ocorrência de hemólise. Este resultado pode ser considerado complementar ao obtido por VILAS-BOAS *et al.*, 2010 que em seu trabalho analisou 50 pacientes com AF (22 homens e 28 mulheres, idade média de $17 \pm 10,5$ anos) e 28 controles saudáveis e observou associação entre os valores de LDH e VCAM-1 em indivíduos com AF, onde o grupo com a doença possuía maiores níveis de VCAM-1 e lactato desidrogenase.

Através da obtenção de valores significantes para a correlação entre os níveis séricos de VCAM-1 e valores de bilirrubinas foi constatada a provável correlação que corrobora para a hipótese de relação entre aumento do nível sérico de VCAM-1 e elevação da hemólise com consequente quadro de icterícia por conta do aumento geral de bilirrubina. KATO *et al.*, 2005 em seu estudo utilizou plasma de 160 pacientes adultos com AF em estado estacionário para mensurar os níveis de moléculas de adesão solúveis derivadas do endotélio e tinha como objetivo justificar a utilização de VCAM-1 e outras dessas moléculas de adesão como biomarcadores substitutos para caracterizar vasculopatia e disfunção endotelial em estudos populacionais de pacientes com anemia falciforme. Seu estudo correlacionou os valores de bilirrubinas com níveis de VCAM-1 em escala logarítmica, onde foram demonstrados resultados similares aos do obtidos para esse marcador de hemólise no presente estudo. Mostrando que em análises de grupos amostrais maiores o referido resultado de correlação entre níveis séricos de VCAM-1 e valores de bilirrubinas também foi significativo

e contribui para a hipótese de relação do nível sérico da molécula de adesão com quadros de hemólise em portadores de AF.

Em relação aos níveis séricos de VCAM-1 e valores de HbF não foi possível estabelecer provável relação por significância negativa ao submeter à correlação. Tal resultado, reflete a interferência da junção de pacientes em uso de HU com os que não utilizavam durante a análise dos valores de hemoglobina fetal. Diferentemente dos resultados encontrados na literatura, a correlação entre níveis de VCAM-1 e hemoglobina fetal não apresentou significância. A literatura relata aumento dos níveis de HbF por pacientes com AF e como parte dos pacientes não faziam uso do medicamento e tiveram os valores dessa hemoglobina correlacionados juntos com os pacientes que usavam ao nível sérico de VCAM-1 a provável correlação de redução do estado inflamatório provocada pelo medicamento que, consequentemente, causaria redução dos níveis séricos de VCAM-1 não foi observada.

Outro achado relevante foi à correlação significativa entre o grau de anemia grave e aumento nos níveis de VCAM-1. Esse resultado corrobora a hipótese de exacerbação da hemólise e consequente redução da concentração hemoglobina nos eritrócitos por conta do aumento da adesão mediado pelo elevado nível de VCAM-1 no endotélio vascular.

A correlação entre o uso de hidroxiureia e valores de VCAM-1 não foi significativa. Essa achado foi obtido por conta da interferência dos valores de níveis séricos elevados de VCAM-1 nos pacientes que não usavam o medicamento, não sendo possível determinar a correlação do uso de HU com redução de níveis séricos da molécula de adesão em pacientes que usavam e nos que não utilizavam. Sendo que, na literatura consultada a HU tende a reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatória, contribuindo para a hipótese de redução dos níveis séricos de VCAM-1 (DAMANHOURI *et al.*, 2015).

6 CONCLUSÃO

- Foi estabelecida a comparação estatisticamente significativa entre os níveis séricos de VCAM-1 entre o grupo de pacientes com AF e o grupo controle.
- Foi observada correlação entre os níveis séricos de VCAM-1 e biomarcadores de hemólise. Entretanto, não foi estabelecida a correlação entre os níveis séricos de VCAM-1 com os níveis de HbF e contagem de reticulócitos. Os níveis séricos de VCAM-1 foram correlacionados com o grau de anemia.
- Não foi obtida comparação entre o uso ou não de HU e níveis séricos de VCAM-1.

REFERÊNCIAS

- ABAN, I. et al. Severe anemia early in life as a riskfactor for sickle-cellkidneydisease. **Blood**, v. 129, n. 3, p. 385–387, 19 jan. 2017.
- ANTONIO, B. Anemia falciforme: polimorfismos gênios em moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1), TNF-ALFA-, IL-8 e alterações fenotípicas. **Fiocruz.br**, 2022.
- ARAÚJO, A.K.L. de; ROCHA, S.S. da; SANTOS, L.R.O. et al. Características sociodemográficas e epidemiológicas de crianças com anemia falciforme. **Revista de Enfermagem UFPE**. p. 1553-1560, 2014.
- BALLAS, S. K. More definitions in sicklecelldisease: Steadystate v base line data. **American JournalofHematology**, v. 87, n. 3, p. 338–338, 1 mar. 2012.
- COSTA, F. F.; Anemia Falciforme - cap 27, **Tratado de Hematologia**, 11/2013, ed. 1, 1, Atheneu, Vol. 1, pp. 19, pp.205-223, 2013
- DAMANHOURI, G. A. et al. Clinicalbiomarkers in sicklecelldisease. **Saudi JournalofBiologicalSciences**, v. 22, n. 1, p. 24–31, jan. 2015.
- DUIITS, A. J. et al. EnhancedLevelsofSoluble VCAM-1 in SickCellPatientsandTheirSpecificIncrementduringVasocclusiveCrisis. **ClinicalImmunologyandImmunopathology**, v. 81, n. 1, p. 96–98, out. 1996.
- FERREIRA, J. C.; PATINO, C. M. What does the p valureallymean? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, n. 5, p. 485, 2015.
- FIGUEIRA, C. O. et al. MainComplicationsduringPregnancyandRecommendations for AdequateAntenatalCare in SickCellDisease: A LiteratureReview. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO GynecologyandObstetrics**, v. 44, n. 06, p. 593–601, 9 fev. 2022.
- IVONE, M. Biomarcadores de lesão na nefropatia falciforme. **Ri.ufs.br**, 2012.
- JANAINA MARTINS SOUZA et al. FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME. **Revista Transformar**, v. 8, n. 8, p. 162–178, 2016.
- LILIANNE, S. Caracterização clínica, hematológica e molecular dos pacientes com anemia falciforme em Fortaleza, Ceará. **Repositorio.ufc.br**, 2022.
- LOBO, C.; MARRA, V. N.; SILVA, R. M. G. Crises dolorosas na doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, set. 2007.

KATO, G. J. et al. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *British Journal of Haematology*, v. 130, n. 6, p. 943–953, set. 2005.

MACHADO, A. et al. ANEMIA FALCIFORME: ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://home.unicruz.edu.br/seminario/anais/anais-2018/XXIII%20SEMINARIO%20INTERINSTITUCIONAL/Ciencias%20Biologicas%20e%20da%20Saude/Mostra%20de%20Iniciacao%20Cientifica%20-%20TRABALHO%20COMPLETO/ANEMIA%20FALCIFORME%20ASPECTOS%20CL%C3%8DNICOS%20E%20EPIDEMIOLOGICOS.pdf>>.

MANFREDINI, V. et al. A FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 19, n. 1/2, p. 3–6, 2014.

MEIRE APARECIDA TOSTES; APARECIDA, J.; CLAUDIO ARNALDO LEN. Abordagem da crise dolorosa em crianças portadoras de doença falciforme. **Revista de Ciências Médicas**, v. 18, n. 1, 2012.

MOTA, F. M. et al. Analysis of the temporal trend of mortality from sickle cell anemia in Brazil. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 75, n. 4, 2022.

NEVES, Ú. Aprovado uso do medicamento crizanlizumabe para doença falciforme no país. Disponível em: <<https://pebmed.com.br/aprovado-uso-do-medicamento-crizanlizumabe-para-doenca-falciforme-no-pais/>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

PATHARE, A.; KINDI, A. S.; DAAR, S.; DENNISON, D. Cytokines in sickle cell disease. **Health Science**, v. 8, p. 329-337, 2003.

QUIRINO, É. REDIB. Disponível em: <https://redib.org/Record/oai_articulo3001625-uso-da-hidroxiur%C3%A9ia-na-anemia-falciforme-uma-revis%C3%A3o-da-literatura>. Acesso em: 10 nov. 2022.

SBPC/ML - Home. Disponível em: <<https://www.sbpc.org.br/pt/>>. Acesso em: 1 dez. 2022.

TAVAKKOLI, F; *et al.* Plasma Level of TNF- in Sickle Cell Patients Receiving Hydroxyurea. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1024533032000158869>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

TEXEIRA F. S. **Rev. Médica de Minas Gerais**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.rmmg.org/content/imagebank/pdf/v22n3a11.pdf>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

VILAS-BOAS, W. et al. Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and hemolysis markers among steady-state sickle cell anemia patients. **Annals of Hematology**, v. 89, n. 9, p. 877–882, 20 abr. 2010.

WHITE, J. et al. Cross-sectional analysis of adhesion in individuals with sickle cell disease using a standardized whole blood adhesion bioassay to VCAM-1. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 81, p. 102397, mar. 2020.

ZAGO, M.A; SILVA PINTO, A.C. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. bras. hematol. hemoter.** Brasil, v.29, n.3, p. 207-214, Jul. 2007.