



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

**ANTONIA KARINE BARROS NOJOSA**

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DO FATOR REGULADOR DE INTERFERON  
4 (rs1877176) NA CLÍNICA E NOS NÍVEIS SÉRICOS DO INTERFERON-GAMA, EM  
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

**FORTALEZA**

**2023**

**ANTONIA KARINE BARROS NOJOSA**

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DO FATOR REGULADOR DE INTERFERON  
4 (rs1877176) NA CLÍNICA E NOS NÍVEIS SÉRICOS DO INTERFERON-GAMA, EM  
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para 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)

---

- N66i Nojosa, Antonia Karine Barros.  
Influência do polimorfismo do fator regulador de interferon 4 (rs1877176) na clínica e nos níveis séricos do interferon-gama, em pacientes com anemia falciforme / Antonia Karine Barros Nojosa. – 2023.  
62 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. anemia falciforme. 2. polimorfismo genético. 3. fatores reguladores de interferon. 4. interferon gama. I. Título.

---

CDD 615

**ANTONIA KARINE BARROS NOJOSA**

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DO FATOR REGULADOR DE INTERFERON  
4 (rs1877176) NA CLÍNICA E NOS NÍVEIS SÉRICOS DO INTERFERON-GAMA, EM  
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

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

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa Dra. Arlandia Cristina Lima Nobre de Moraes  
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

---

Profa. Dra. Renata Alves de Sousa  
Universidade Federal do Ceará – UFC

## AGRADECIMENTOS

À minha família: meus pais, Tereza e Fernando, as minhas irmãs Clarycy e Karisia, a minha sobrinha Laryssa e ao meu namorado Sâmeque pelo amor incondicional e o cuidado comigo, principalmente nos momentos mais difíceis da minha vida e por estarem sempre ao meu lado, incentivando-me a não desistir dos meus sonhos.

À minha orientadora professora Romélia, pelos ensinamentos e amizade, pela paciência e dedicação e por todo o carinho. Sem a senhora, hoje eu não estaria alcançado o sonho de ser mestre.

Ao professor Tiago pela coorientação, auxiliando com o banco de dados e análises estatísticas e o compromisso no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos Joana, Rafael e Florindo do PPGO pelo companheirismo e pelos momentos de descontração e apoio que sempre me deram. Tenho grande carinho e admiração por vocês e eu sempre estarei à disposição em qualquer momento.

Ao Luan e Leonardo que se dedicaram em me ajudar durante o curso desse trabalho.

Às professoras Arlandia e Renata por compartilhar saberes e enriquecer esta dissertação.

Ao HEMOCE pelo fornecimento das informações.

Aos pacientes com anemia falciforme e aos doadores voluntários do HEMOCE que gentilmente aceitaram participar desta pesquisa.

## RESUMO

Na anemia falciforme (AF), a inflamação crônica está associada ao dano endotelial, produtos de hemólise e geração de espécies reativas de oxigênio. O aumento dos níveis de citocinas como o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e polimorfismos genéticos podem interferir no prognóstico dos pacientes com AF, ressaltando-se que polimorfismo em fatores reguladores de interferon estão associados com a inflamação e com a síntese dessa citocina. O objetivo do estudo foi avaliar a influência do polimorfismo rs1877176 do fator regulador de interferon 4 (IRF4) nas complicações clínicas e no perfil de IFN- $\gamma$ , em pacientes com AF. Trata-se de um estudo transversal e analítico, incluindo 72 pacientes com diagnóstico de AF (HbSS) do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) e 85 doadores de sangue como grupo controle (HbAA). Os dados sociodemográficos (idade e sexo), laboratoriais (HbS, HbF, HbA<sub>2</sub>, hemograma, contagem de reticulócitos, LDH, bilirrubina indireta, AST) e clínicos [uso de hidroxiureia (HU) e as complicações clínicas: crise álgica, acidente vascular cerebral (AVC), síndrome torácica aguda, osteomielite, infecções recorrentes, alterações renais, doenças cardíacas, hepatomegalia, colelitíase e úlcera de perna] foram obtidos de prontuários clínicos. A análise do polimorfismo foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR) utilizando sonda TaqMan<sup>®</sup>. Os níveis séricos de IFN- $\gamma$  foram mensurados pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). As análises estatísticas foram realizadas através dos *softwares* SPSS<sup>®</sup> versão 22 e GraphPad Prism<sup>®</sup> 6.01, adotando  $p < 0,05$ . Os resultados deste estudo mostraram que a maioria dos pacientes foram do sexo feminino, com idade entre 18 e 59 anos e em uso de HU. Com relação a frequência alélica e genotípica do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176, o alelo G (mutante) e o genótipo GG (homozigoto mutante) foram prevalentes nos pacientes e controles, não havendo diferença estatística entre os grupos. Verificou-se que o alelo A (selvagem) conferiu maior risco de desenvolver AVC. Não houve diferença significativa entre o polimorfismo e os parâmetros laboratoriais. Houve um aumento significativo nos níveis séricos de IFN- $\gamma$  de pacientes com AF em relação ao grupo controle e a presença do genótipo GG foi associada com a redução de IFN- $\gamma$ . Conclui-se que a presença do alelo G e do genótipo GG na AF para o IRF4 na região rs1877176 configura proteção para complicações clínicas como o AVC, assim como para a redução nos níveis de IFN- $\gamma$ , portanto modulando o processo inflamatório na doença.

**Palavras-chave:** anemia falciforme; polimorfismo genético; fatores reguladores de interferon; interferon gama.

## ABSTRACT

In sickle cell anemia (SCA), chronic inflammation is associated with endothelial damage, hemolysis products, and generation of reactive oxygen species. Increased levels of cytokines such as interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and genetic polymorphisms may interfere with the prognosis of patients with AF, highlighting that polymorphisms in interferon regulatory factors are associated with inflammation and the synthesis of this cytokine. The objective of this study was to evaluate the influence of interferon regulatory factor 4 (IRF4) polymorphism in the rs1877176 region, with clinical complications and with the serum IFN- $\gamma$  profile in patients with SCA. This is a cross-sectional and analytical study, including 72 patients diagnosed with AF (HbSS) from the Hematology and Hemotherapy Center of Ceará (HEMOCE) and 85 blood donors as a control group (HbAA). Sociodemographic (age and gender), laboratory (HbS, HbF, HbA<sub>2</sub>, complete blood count, reticulocyte count, LDH, indirect bilirubin, AST) and clinical data [use of hydroxyurea (HU) and clinical complications: pain crisis, cerebrovascular accident (AVC), acute chest syndrome, osteomyelitis, recurrent infections, renal alterations, heart disease, hepatomegaly, cholelithiasis and leg ulcer] were obtained of clinical records. The analysis of the polymorphism was performed by the real-time polymerase chain reaction (PCR) technique using a TaqMan® probe. Serum IFN- $\gamma$  levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Statistical analyses were performed using SPSS® version 22 and GraphPad Prism® 6.01 software, adopting  $p < 0.05$ . The results of this study showed that most of the patients were female, aged between 18 and 59 years and using UH. Regarding the allelic and genotypic frequency of the IRF4 gene polymorphism in the rs1877176 region, the G allele (mutant) and the GG genotype (mutant homozygote) were more prevalent in patients and controls, with no statistical difference between these groups. The A allele (wild) was found to confer a higher risk of developing stroke. There was no significant difference between the polymorphism and the laboratory parameters. There was a significant increase in serum IFN- $\gamma$  levels in patients with SCA compared to the control group and the presence of the GG genotype was associated with reduced serum IFN- $\gamma$  levels. It is concluded that the presence of the G allele and the GG genotype in FA for IRF4 in the rs1877176 region configures protection against clinical complications such as stroke, as well as for the reduction in IFN- $\gamma$  levels, thus modulating the inflammatory process in the disease.

**Keywords:** sickle cell anemia; polymorphism genetic; interferon regulatory factors; interferon-gamma.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Alteração na sequência de bases da cadeia da beta-globina, responsável pela formação da hemoglobina S. ....	15
Figura 2 - Representação dos nascidos com anemia falciforme no mundo.....	16
Figura 3 – Fisiopatologia, estímulos inflamatórios e interações celulares na anemia falciforme. ....	17
Figura 4 - Complicações clínicas na anemia falciforme.....	19
Figura 5 – Mecanismos inflamatórios na anemia falciforme. ....	23
Figura 6 - Síntese de IFN- $\gamma$ em células T, macrófagos e células dendríticas em um microambiente inflamado ou tumoral.....	25
Figura 7 - Representação esquemática da localização do gene de IRF4 no cromossomo 6.....	27
Figura 8 - Genotipagem do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 pela reação em cadeia da polimerase em tempo real, utilizando sistema TaqMan <sup>®</sup> .....	35
Figura 9 - Comparação entre as concentrações de hemoglobina fetal (HbF) entre os genótipos do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 em pacientes com AF.....	39
Figura 10 - Associação da concentração de HbF (%) com os genótipos AG e GG do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 em pacientes sem o uso de HU.....	40
Figura 11 – Comparação dos níveis séricos de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) entre os grupos pacientes com anemia falciforme (AF) e controle.....	41
Figura 12 - Associação dos genótipos do polimorfismo do gene do fator regulador de interferon 4 (IRF4) na região rs1877176 com os níveis séricos de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) em pacientes com anemia falciforme (AF) com e sem o uso de hidroxiureia (HU).....	42



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados sociodemográficos, laboratoriais e clínicos de pacientes com AF (n = 72) e do grupo controle (n = 87).....	34
Tabela 2 - Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo no gene IRF4 na região rs1877176 nos grupos pacientes com anemia falciforme e controles. ....	36
Tabela 3 - Associação entre as complicações clínicas, os genótipos e a frequência alélica do polimorfismo no gene IRF4 na região rs1877176 em pacientes com AF (n= 72). ....	37
Tabela 4 - Relação entre os parâmetros laboratoriais (hemograma e marcadores de hemólise) e os genótipos do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 em pacientes com AF.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia falciforme
AST	Aspartato aminotransferase
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BCAM/ Lu	Molécula de adesão celular basal-1/Lutheran
BEB	<i>Back Extraction Buffer</i>
BI	Bilirrubina indireta
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
DAMP	Padrões moleculares associados ao perigo
DF	Doença Falciforme
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HbA <sub>2</sub>	Hemoglobina AA
HbF	Hemoglobina F
HbS	Hemoglobina S
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
HLA	Antígeno leucocitário humano
Hp	Haptoglobina
HU	Hidroxiureia
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
iNKT	Célula T <i>natural killer</i> invariante
IRF	Fator regulador de interferon

IRF4	Fator regulador de interferon 4
LACT	Laboratório de análises clínicas e toxicológicas
LDH	Lactato desidrogenase
LBFBC	Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
LPHGDH	Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética de Doenças Hematológicas
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
NET	Armadilha extracelular de neutrófilos
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NO	Óxido nítrico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PS	Fosfatidilserina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SMD	Síndrome mielodisplásica
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
STA	Síndrome torácica aguda
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
TCD	<i>Doppler</i> transcraniano convencional
TGF- $\beta$	Fator de transformação de crescimento beta
TLR4	Receptor Toll-like 4
TNF	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará
VCM	Volume corpuscular médio
VOC	Crise vaso-oclusiva

## LISTA DE SÍMBOLOS

A	Adenina
dL	Decilitro
$\gamma$	Gama
g	Gramma
°C	Graus Celsius
®	Marca Registrada
>	Maior que
$\geq$	Maior ou igual a
<	Menor que
$\mu$ L	Microlitro
mg	Miligramma
mm <sup>3</sup>	Milimetro cúbico
nm	Nanômetro
%	Porcentagem
rpm	Rotação por minuto
kDa	QuiloDalton
kg	Quilogramma
T	Timina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Anemia Falciforme .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2</b>	<b>Fisiopatologia e complicações da anemia falciforme.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3</b>	<b>Tratamento .....</b>	<b>21</b>
<b>1.4</b>	<b>Inflamação na anemia falciforme.....</b>	<b>22</b>
<b>1.5</b>	<b>Polimorfismos .....</b>	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Aspectos éticos .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>Delineamento do estudo .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3</b>	<b>Local do estudo .....</b>	<b>30</b>
<b>3.4</b>	<b>Casuística.....</b>	<b>30</b>
<b>3.5</b>	<b>Seleção da amostra .....</b>	<b>31</b>
<b>3.6</b>	<b>Coleta de dados .....</b>	<b>31</b>
<b>3.7</b>	<b>Análise laboratorial .....</b>	<b>31</b>
<b>3.8</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>
	<b>APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES.....</b>	<b>57</b>
	<b>APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLE .....</b>	<b>58</b>
	<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA .....</b>	<b>59</b>

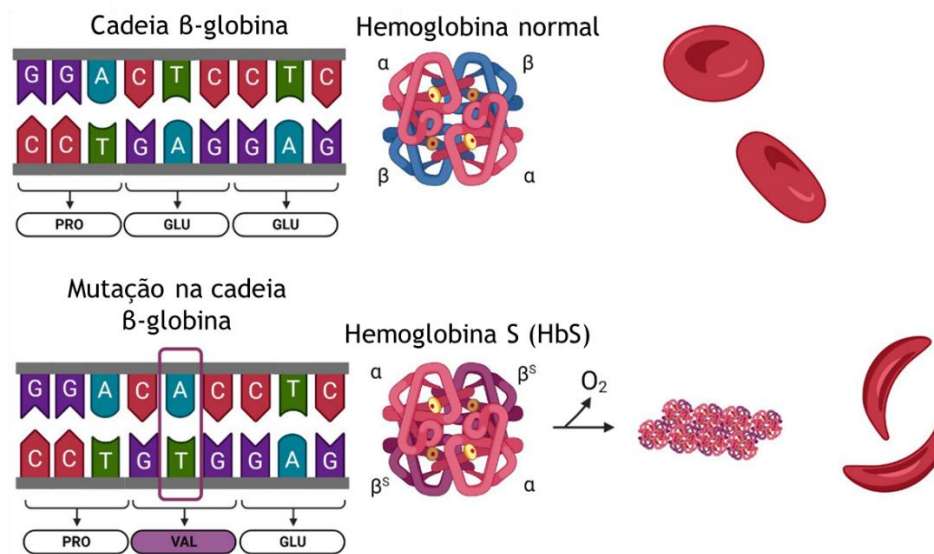
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Anemia Falciforme

A anemia falciforme (AF) foi relatada em 1910 por Herrick ao verificar que as hemácias de um estudante apresentavam formato alongado e em forma de foice. Pauling e Ingram, em 1949 e 1957 respectivamente, descreveram em seus trabalhos a presença de HbS (hemoglobina S) e que sua origem era ocasionada por uma substituição do ácido glutâmico por valina na cadeia da  $\beta$ -globina (WILLIAMS; THEIN, 2018).

O termo doença falciforme (DF) é utilizado para denominar uma categoria de hemoglobinopatias hereditárias e crônicas de maior ocorrência no Brasil (SILVA; RAMALHO; CASSORLA, 1993; DE JESUS et al., 2018; SARAT et al., 2019; CANÇADO et al., 2021). A DF é uma doença autossômica recessiva ocasionada por uma mutação no gene da beta-globina, resultando na substituição de uma única base nitrogenada, adenina (A) por timina (T), na sexta posição do cromossomo 11, resultando na troca do ácido glutâmico por valina (Figura 1). Essa mutação resulta na formação de uma hemoglobina considerada anormal, a HbS, que se polimeriza em condições de baixa tensão de oxigênio ou alteração do pH, alterando a estrutura da hemácia, que apresentará um formato diferente, denominado de drepanócito ou hemácia falciforme (STEINBERG, 2006; WILLIAMS; THEIN, 2018; SILVA-PINTO et al., 2022). Esse processo é reversível, todavia, sua repetição afeta a viabilidade e reologia das hemácias, culminando em hemólise, vaso-occlusão e dano tecidual (SAUNTHARARAJAH, 2019).

Figura 1 - Alteração na sequência de bases da cadeia da beta-globina, responsável pela formação da hemoglobina S.

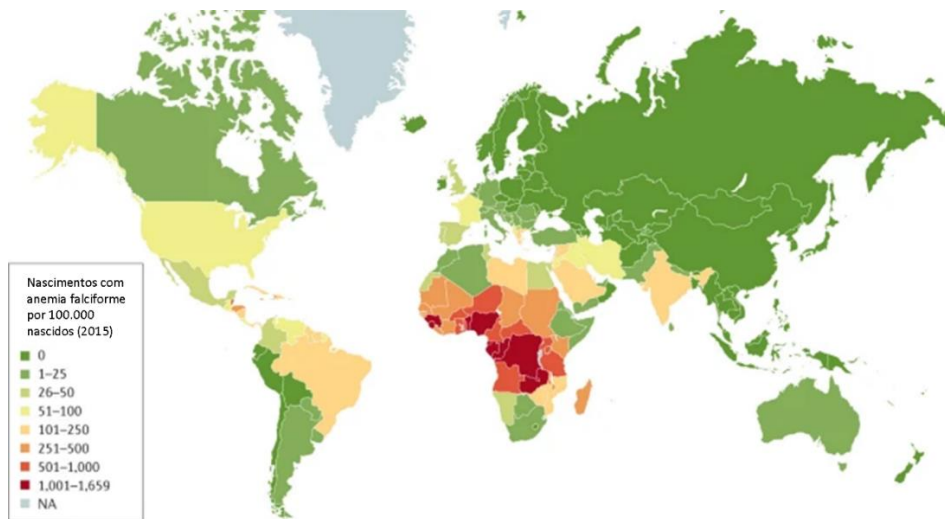


Fonte: Adaptada de RAMADAS; SPARKENBAUGH, 2023. Legenda: A hemoglobina normal é formada por duas subunidades  $\alpha$ -globina e duas subunidades  $\beta$ -globina. Na doença falciforme, uma substituição de adenina por timina no 6º códon da cadeia  $\beta$ -globina, leva a substituição de glutamina (GLU) para valina (VAL), formando a hemoglobina S (HbS). A HbS após a desoxigenação e na presença de um resíduo hidrofóbico de valina na HbS, polimeriza-se, levando ao enrijecimento e alteração da estrutura do eritrócito, originando as hemácias falciformes.

A AF é caracterizada pela presença da HbS em homozigose (HbSS) e classificada como a forma mais grave da DF. Seu tratamento requer o diagnóstico precoce e o manejo da doença por meio da prevenção das complicações que podem ocasionar o óbito (BRANDOW; LIEM, 2022). A HbS pode ocorrer em heterozigose com outras mutações, como HbSC, HbSE, HbS/ $\beta$ -thal levando a outras formas da DF (SUNDD, GLADWIN, NOVELLI, 2019).

A AF tem uma alta prevalência em países subdesenvolvidos como os da África Subsaariana, com uma estimativa de mais de 200.000 neonatos com AF (Figura 2). (COLOMBATTI; BIRKEGÅRD; MEDICI, 2022; MOTA et al., 2022).

Figura 2 - Representação dos nascidos com anemia falciforme no mundo.



Fonte: Adaptado de KATO et al., 2018. Legenda: Mapa da estimativa do número de nascidos com anemia falciforme por 100.000 nascidos por país em 2015. Abreviatura: Não se aplica (NA).

No Brasil, a incidência da AF predomina nos indivíduos afrodescendentes, ocorrendo de forma variada entre os estados brasileiros. Em 2014, a Bahia teve a maior incidência de nascidos com AF, registrando 1 em cada 650 neonatos (KATO et al., 2018). O diagnóstico da AF é realizado através do Programa Nacional de Triagem Neonatal, e segundo o Ministério da Saúde, estima-se mais de 3.000 novos casos por ano (RAMOS et al., 2015; MOTA et al., 2022).

## 1.2 Fisiopatologia e complicações da anemia falciforme

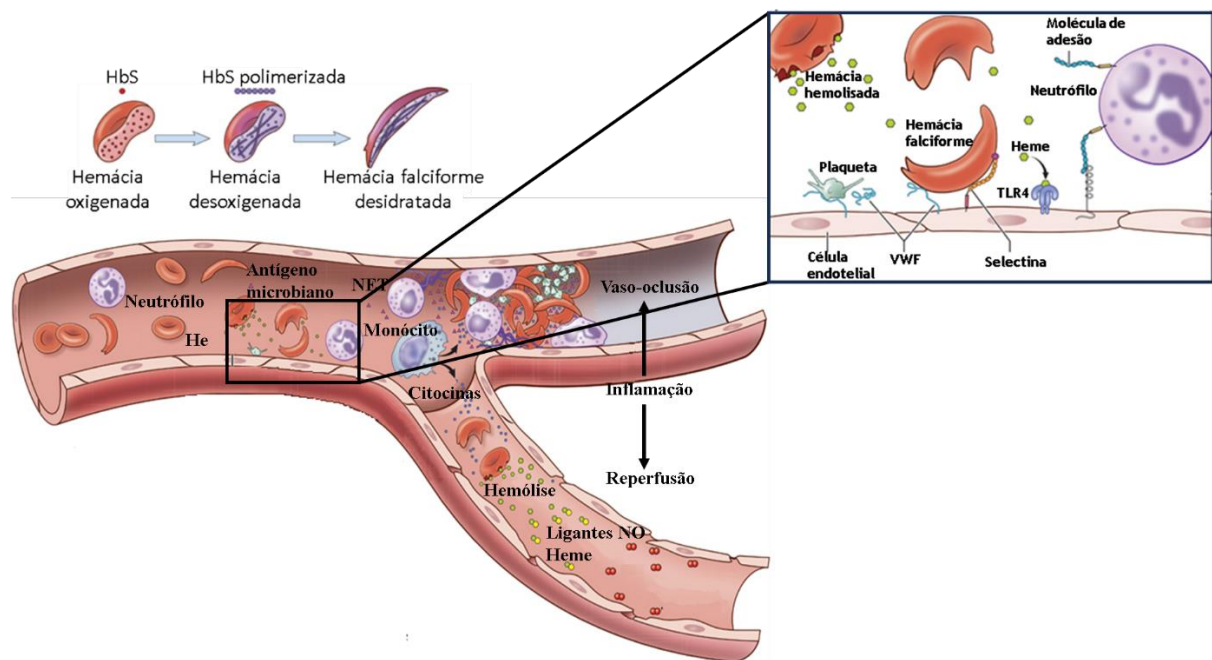
A fisiopatologia da AF envolve mecanismos como a polimerização da HbS, a vaso-oclusão, a disfunção do endotélio e a inflamação que conduzem às manifestações clínicas da doença. De fato, a polimerização da HbS é um fator dominante na AF, responsável por processos que resultam em vaso-oclusão e dano endotelial mediado pela hemólise (SUNDD, GLADWIN, NOVELLI, 2019). Para que o fenômeno da polimerização ocorra, é necessário que a HbS esteja desoxigenada, em elevada concentração e que haja um retardo na circulação, uma vez, que a HbS ao se oxigenar novamente, esse fenômeno não ocorre (ZAGO; PINTO, 2007).

A polimerização da HbS além de causar a rigidez da hemácia e deformação da membrana, caracterizando a hemácia falciforme, resulta também em múltiplas alterações como a desidratação dessa hemácia mediada pelo influxo de cálcio, e desta forma aumentando a



concentração intracelular e a polimerização da HbS; bem como, o efluxo de potássio; modificações na membrana como a exposição de moléculas de adesão; o estresse celular; alteração das propriedades reológicas e a hemólise (Figura 3) (ZAGO; PINTO, 2007; WILLIAMS; THEIN, 2018; SUNDD, GLADWIN, NOVELLI, 2019).

Figura 3 – Fisiopatologia, estímulos inflamatórios e interações celulares na anemia falciforme.



Fonte: Adaptado de WILLIAMS; THEIN, 2018. Legenda: A polimerização da desoxi-HbS forma hemácias falciformes. Estas ocasionam vaso-oclusão por meio de interações com neutrófilos e plaquetas ativadas e adesão ao endotélio vascular, levando a isquemia e hipóxia tecidual seguida de vasodilatação e lesão de reperusão. A hemólise crônica das hemácias falciformes libera hemoglobina e heme continuamente. A Hb oxidada reduz a biodisponibilidade de NO, resultando em disfunção vascular, ativação de células endoteliais e plaquetas. O heme ativa células endoteliais, macrófagos e neutrófilos e promove a formação de NETs por meio da ligação de TLR4. Abreviaturas: hemoglobina S (HbS), Armadilha extracelular de neutrófilos (NET), Óxido nítrico (NO), Hemácia (HE), Espécies reativas ao oxigênio (ERO), Fator de von Willebrand (VWF), Receptor Toll-like 4 (TLR4).

A vaso-oclusão é resultado da alteração da reologia sanguínea, ativação e adesão celular ao endotélio. O aumento da viscosidade plasmática ocasionada pela hemólise crônica e rigidez da hemácia falciforme compromete o fluxo sanguíneo em capilares e vênulas pós-capilares, promovendo uma vaso-oclusão transitória. As hemácias falciformes expressam na superfície externa um maior número de moléculas de adesão como a fosfatidilserina (PS) e a molécula de adesão celular basal-1/*Lutheran* (BCAM-1/Lu) que favorecem a interação com o endotélio e a propagação da vaso-oclusão (ZAGO; PINTO, 2007; SUNDD, GLADWIN, NOVELLI, 2019).

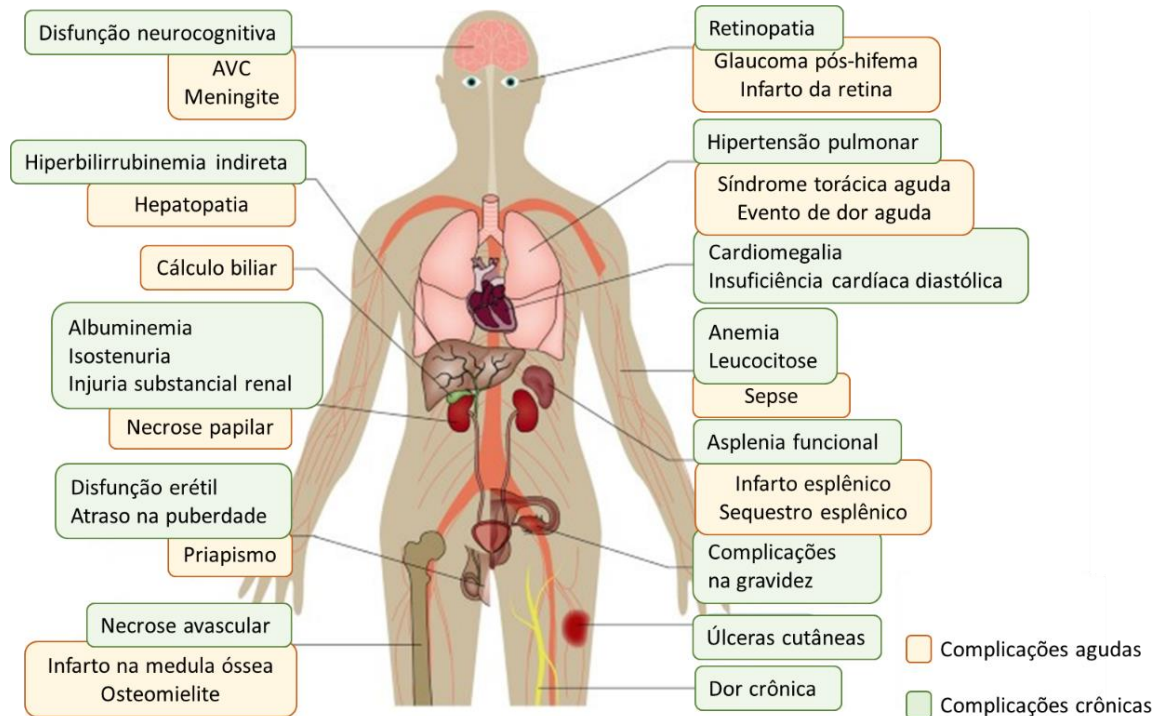
A disfunção endotelial constitui um fator importante na inflamação e na vaso-occlusão. As células endoteliais são ativadas pela adesão de hemácias falciformes, hemoglobina (Hb) livre, arginase e por espécies reativas de oxigênio (ROS). A arginase causa redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), ocasionando a vasoconstrição. Este processo retarda o fluxo sanguíneo, de forma a contribuir com a polimerização da HbS e formação da hemácia falciforme. As células endoteliais ativadas também liberam endotelina-1, que estimula monócitos a secretarem citocinas inflamatórias como interleucinas 6 (IL-6) e 8 (IL-8) e fator de necrose tumoral (TNF), levando a um estado inflamatório crônico (KATO et al., 2018).

A inflamação promove a ativação de plaquetas e neutrófilos, aumentando a adesão entre essas células e o endotélio ativado. Plaquetas ativadas liberam multímeros de von Willebrand, que favorecem sua ligação com o endotélio e a hemácia falciforme. Os neutrófilos ativados se deslocam para o local da inflamação, onde aumentam a expressão de integrina  $\alpha M\beta 2$  e outras moléculas de adesão, facilitando sua aderência ao endotélio e a outros neutrófilos, culminando na vaso-occlusão. Recentemente, evidências demonstraram a contribuição do receptor Toll-like 4 (TLR4) na adesividade dos neutrófilos ao endotélio. A translocação TLR4 para a circulação sanguínea ativa monócitos e macrófagos a liberarem citocinas inflamatórias, promovendo o aumento da adesão de neutrófilos (SUNDD, GLADWIN, NOVELLI, 2019). Estudos tem evidenciado que a frequência elevada das crises vaso-oclusivas (VOC) na AF é iniciada por processos inflamatórios oriundos de infecção, hipóxia, dentre outros fatores (SUNDD, GLADWIN, NOVELLI, 2019).

O paciente com AF apresenta anemia hemolítica crônica, marcada pela hemólise descompensada, com valores de Hb em torno de 6 a 11g/dL. Pacientes com Hb baixa têm taxa de hemólise elevada e são mais propensos a apresentarem lesão vascular e disfunção orgânica. A hemólise pode ocorrer de modo extravascular e intravascular. A hemólise extravascular ocorre em menor fração, sendo caracterizada pela fagocitose de macrófagos. A hemólise intravascular ocorre de modo substancial na AF, com a liberação do conteúdo das hemácias falciformes no plasma, causando lesão vascular e disfunção endotelial. A Hb livre age reduzindo o NO disponível, pela reação de dioxigenação, e a depleção de arginina. A oxidação da Hb libera o heme, com capacidade de liberar armadilha extracelular de neutrófilos (NET) e ativar vias imunes inatas, por meio do TLR4, propagando a inflamação e lesão tecidual (KATO et al., 2018; SUNDD, GLADWIN, NOVELLI, 2019).

A AF é caracterizada por ser multissistêmica, ocasionando complicações agudas e crônicas (Figura 4), sendo essas as principais responsáveis pelas internações hospitalares (KATO et al., 2018).

Figura 4 - Complicações clínicas na anemia falciforme.



Fonte: Adaptado de Kato et al., 2018. Legenda: As complicações agudas são as principais responsáveis pelo atendimento hospitalar em pacientes com AF. A crise de dor é o evento de maior ocorrência da complicação aguda. As complicações agudas comprometem os pacientes com AF na medida que envelhecem, causando disfunções orgânicas que contribuem com a mortalidade precoce. As complicações na gravidez induzem ao parto prematuro, causam restrição no crescimento intrauterino, pré-eclâmpsia e mortalidade perinatal. Legenda: Acidente vascular cerebral (AVC).

A VOC é a principal complicação na AF, sendo responsável pelos episódios de dor aguda. Esta é relatada em locais como o tórax, abdômen, costas e ossos longos, afetando pacientes em todas as idades. Condições como temperaturas extremas, desidratação, alterações no ciclo menstrual, uso de álcool ou estresse, são fatores coadjuvantes para desencadear as VOC. A elevada taxa de VOC está associada com a morbimortalidade precoce em decorrência de danos em múltiplos órgãos e seu manejo está na avaliação rápida e no controle da dor por intermédio de analgésicos (TANABE et al., 2019).

A síndrome torácica aguda (STA) está relacionada ao elevado número de óbitos entre os pacientes com AF, sendo a segunda causa em hospitalizações, tendo como origem a vaso-oclusão associada ou não a infecções. A STA é caracterizada por febre, dispneia, dor pleurítica e infiltrados pulmonares em radiografia de tórax. A gravidade da STA tende a ser maior com o aumento da idade e outros fatores como a redução de hemoglobina fetal, hematócrito elevado e tabagismo, tendo a maior taxa de óbitos em pacientes adultos

(ADEWOYIN, 2015; NOVELLI E; GLADWIN, 2016).

O acidente vascular cerebral (AVC) está associado com a morbimortalidade na AF, com incidência maior em crianças e adultos jovens, representando uma taxa de mortalidade de 26% (TANABE et al., 2019). O AVC pode ser isquêmico ou hemorrágico, de início súbito, ocorrendo em 25% dos pacientes com AF (ADEWOYIN, 2015). A incidência de AVC isquêmico é elevada em crianças menores de nove anos, podendo ser evitado por meio da triagem com *doppler* transcraniano e transfusão profilática. Em adultos jovens com AF, a frequência de AVC acomete mais de 50% desses pacientes na faixa etária entre 20 e 29 anos, sendo o AVC hemorrágico relatado com maior prevalência. O risco de desenvolver AVC hemorrágico é maior naqueles pacientes com hemoglobina fetal (HbF) diminuída, leucocitose e hipertensão (TANABE et al., 2019).

O baço é outro importante órgão afetado, cujas funções relacionadas com a defesa imunológica e a homeostase vascular estão comprometidas na AF. O dano ao baço causa disfunções esplênica e imunológica, com atrofia do órgão, deixando o paciente susceptível a infecções e sepse (TANABE et al., 2019). A crise do sequestro esplênico é observada em crianças com AF menores de dois anos, porém acima dessa faixa etária, o risco é reduzido em razão do estado fibrótico do baço com repetidos infartos (ADEWOYIN, 2015). A esplenectomia é recomendada após a ocorrência do segundo episódio de crise do sequestro esplênico, porém essa medida é preocupante em crianças, devido ao maior risco de infecção (MONACO JUNIOR; FONSECA; BRAGA, 2015).

A osteomielite é uma complicação comum, porém de difícil diagnóstico em pacientes com AF, por apresentar semelhança clínica ao infarto ósseo agudo. A osteomielite tem origem bacteriana, causada por *Salmonella spp.* ou *Staphylococcus aureus*, investigada em hemoculturas seriadas e cultura de aspirados ósseos (ADEWOYIN, 2015).

Otras complicações crônicas incluem dor crônica, alterações cardíacas, hipertensão pulmonar, úlceras cutâneas, retinopatia, complicações renais e atraso no crescimento em crianças (ABBOUD, 2020). Os pacientes com AF também desenvolvem a dor crônica, independente da VOC, com o aumento da idade. A dor crônica é descrita como sendo pulsante, com sensação de câibra, sendo associada a componentes inflamatórios e neuropáticos. A dor crônica está associada com a elevada morbidade funcional e psicossocial dos pacientes com AF (BRANDOW; ZAPPIA; STUCKY, 2017). Alterações cardíacas são responsáveis pela morbimortalidade na AF. A ocorrência de hipertrofia cardíaca na infância se desenvolve em resposta ao estado crônico de anemia. A hipertensão pulmonar arterial e venosa na AF está associada a gravidade da anemia, com a disfunção renal e com a sobrecarga de ferro oriunda da

terapia de transfusão (GLADWIN, 2017). A mortalidade cardiovascular também pode ser resultado de complicações dentárias em pacientes com AF, ocasionadas por necrose pulpar, infartos do nervo dentário e danos à mucosa devido a anemia (LAURENCE; HAYWOOD JUNIOR; LANZKRON, 2013). Úlceras de perna são comuns em adultos com AF. Surgem em razão da vaso-oclusão na microvasculatura da pele, agravada por infecção ou traumas, com difícil cicatrização. Retinopatias são menos comuns na AF. A retinopatia proliferativa é caracterizada por hemorragia vítrea e deslocamento da retina, com indicação de exame oftalmológico anual para prevenção a partir dos 20 anos. A vaso-oclusão na medula renal ocasiona hipostenúria e enurese noturna em crianças, tornando-as susceptíveis à desidratação. A acidose promovida pela tubulopatia distal, favorece ainda mais a vaso-oclusão. O atraso no desenvolvimento de crianças com AF está relacionado a inúmeros fatores, dentre eles a anemia grave, má alimentação e ao baixo nível socioeconômico (ADEWOYIN, 2015).

### 1.3 Tratamento

O cuidado ao paciente com AF deve ocorrer de forma integral, devendo incluir informações adequadas sobre o aconselhamento genético, prevenção e as possíveis complicações agudas e crônicas; como também terapias e tratamento adaptados às necessidades individuais de cada paciente. Os pacientes devem ser aconselhados a manter uma hidratação regular e o esquema vacinal em dias, principalmente em crianças. O uso de antibióticos de amplo espectro é recomendado após o resultado de culturas bacterianas em pacientes febris (ADEWOYIN, 2015). Outras terapias que modulam o curso da AF incluem o uso de hidroxiureia (HU), transfusão sanguínea e o transplante de medula óssea (KATO et al., 2018).

A HU inibe de forma reversível a enzima ribonucleotídeo redutase (GOHAL et al., 2022). Este efeito na eritropoiese, leva a estimulação de NO e monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), que sinalizam progenitores eritroides a ativar o gene da  $\gamma$ -globina e a indução da síntese de HbF (BALIGA et al., 2000; KONSTANTINOOU et al., 2011). Outras vantagens descritas para o uso da HU são: o aumento do volume corpuscular médio (VCM), melhorando a reologia da hemácia falciforme; a neutropenia-dose dependente; a redução da expressão de moléculas de adesão ao endotélio; a diminuição de leucócitos e plaquetas e conseqüentemente da inflamação crônica; o aumento de NO e da vasodilatação (PLATT, 2008; MCGANN; WARE, 2015). Para o tratamento na AF, a HU é administrada em crianças e adultos, porém seu uso a longo prazo é questionável, diante de sua associação com efeitos teratogênicos e genotóxicos, e a segurança e eficácia quanto ao uso em longos períodos, ficam obscuros (SEGAL et al., 2008;

SANTOS et al. 2011; PEDROSA; LEAL; LEMES, 2021). Segundo a portaria nº 55 de 2010 do Ministério da Saúde, a dosagem de HU é calculada individualmente para cada paciente, seguindo as seguintes recomendações: dose inicial é feita pela relação 15mg/kg/dia e a dose máxima tolerada é calculada pela relação 35mg/kg/dia sem a ocorrência de toxicidade.

Embora o uso de HU traga benefícios na AF, os efeitos colaterais relacionados a este fármaco são os principais motivos para a interrupção temporária do tratamento (GOHAL et al., 2022). Os mais relatados incluem desconforto gastrointestinal, leucopenia leve, hiperpigmentação de unhas e pele, neutropenia leve e reticulopenia leve (MCGANN; WARE, 2015).

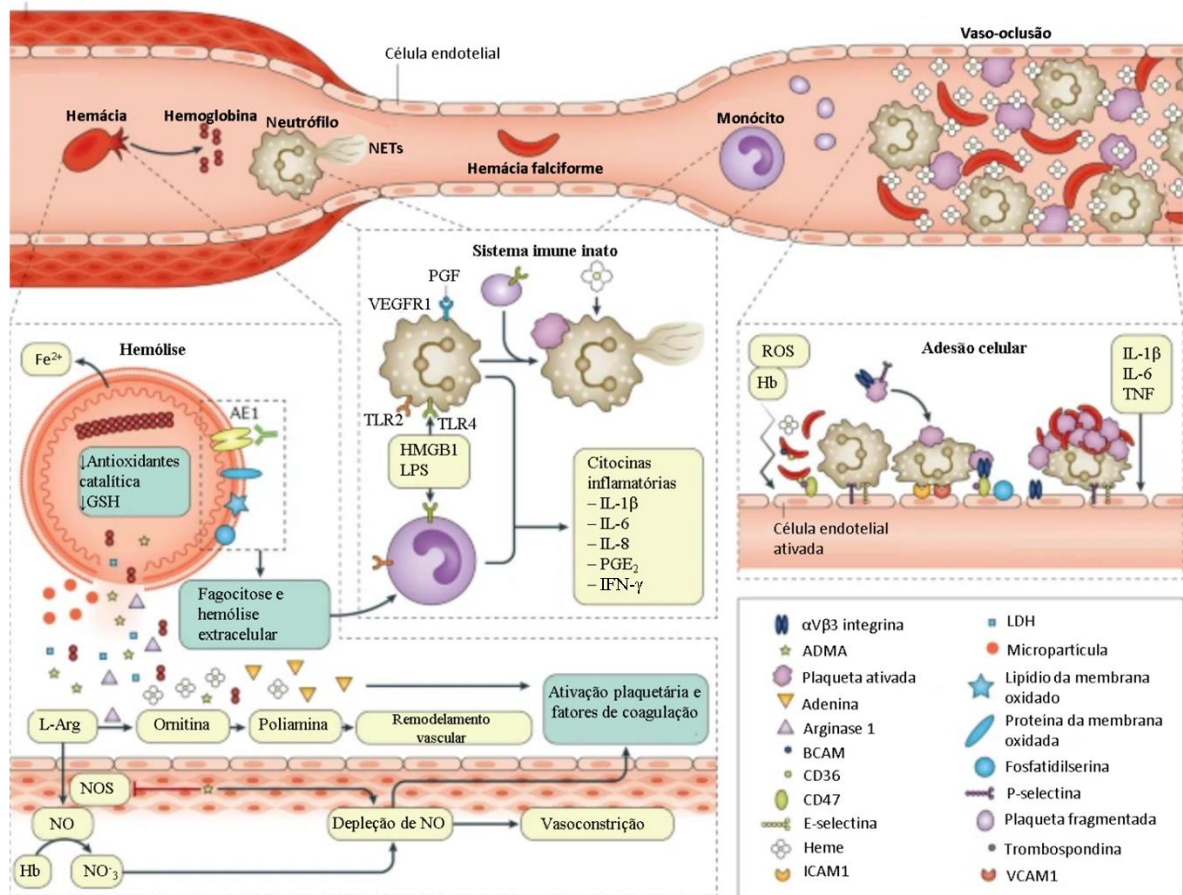
A transfusão sanguínea está associada com a diminuição do processo inflamatório e do dano endotelial, devido à redução de hemácias falciformes e melhora do fluxo da microvasculatura (KATO et al., 2018). É prescrita para pacientes com risco elevado de AVC. A transfusão foi associada a uma redução de 92% de AVC em crianças. No entanto, os efeitos da sobrecarga secundária de ferro limitam sua utilização (WILLIAMS; THEIN, 2018).

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é curativo em pacientes com AF. Cerca de 2.000 pacientes sintomáticos realizaram TCTH com sobrevida de 90% e com taxa média de rejeição de 14%. No entanto, o transplante apenas é considerado quando há um doador compatível quanto ao antígeno leucocitário humano (HLA) (KATO et al., 2018).

#### **1.4 Inflamação na anemia falciforme**

A AF é caracterizada por um processo inflamatório sistêmico, podendo ocorrer no estado estacionário. A polimerização da HbS na AF resulta em inúmeras consequências, como a vaso-oclusão e o processo inflamatório, sendo este, um importante componente de várias complicações na AF (CONRAN; BELCHER, 2018; KATO et al., 2018; TCHOPBA et al., 2021). A figura 5 mostra os principais mecanismos que desencadeiam o estado inflamatório crônico na AF. A polimerização da HbS predispõe a hemácia a alterações intracelular e na sua membrana, prejudicando sua deformabilidade, tornando-a mais adesiva e susceptível à hemólise, à ativação do sistema imune inato e de fatores de coagulação, que contribuem para o processo inflamatório (CONRAN; BELCHER, 2018).

Figura 5 – Mecanismos inflamatórios na anemia falciforme.



Fonte: Adaptado de Kato et al., 2018. Legenda: Danos na membrana da hemácia causados pela polimerização da HbS ocasionam eventos como a hemólise extravascular, promovida por macrófagos, e intravascular com liberação de conteúdo no plasma, desencadeando uma cascata de reações. Estas causam redução da biodisponibilidade de NO resultando na vasoconstrição e remodelação vascular, ativação de plaquetas e fatores de coagulação sanguínea, bem como no aumento de moléculas de adesão que culminam em vaso-oclusão. Há liberação de citocinas inflamatórias pelos macrófagos e monócitos ativados. Plaquetas ativadas aderem aos neutrófilos, formando as NETs. Células endoteliais ativadas expressam moléculas de adesão P-selectina e E-selectina, ligando neutrófilos ao endotélio e promovendo a agregação de hemácias e plaquetas, contribuindo com a vaso-oclusão. Abreviaturas: Óxido nítrico (NO), NO sintase (NOS), Hemoglobina (Hb), Espécies reativas ao oxigênio (ROS), Lipopolissacarídeo (LPS), Proteína B1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1), Glutationa (GSH), Lactato desidrogenase (LDH), Prostaglandina E $_2$  (PGE $_2$ ), Fator de necrose tumoral (TNF), Dimetilarginina assimétrica (ADMA), Proteína 1 de adesão celular vascular (VCAM1), Receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR1), Molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1), Molécula de adesão celular basal (BCAM), prostaglandina F (PGF), Armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs).

A ocorrência da falcização repetida da hemácia leva à desidratação e aumento da densidade dessa célula, como também na geração de ROS e oxidação das proteínas de membrana, sendo estas, atuantes na adesividade da hemácia. As hemácias falciformes também

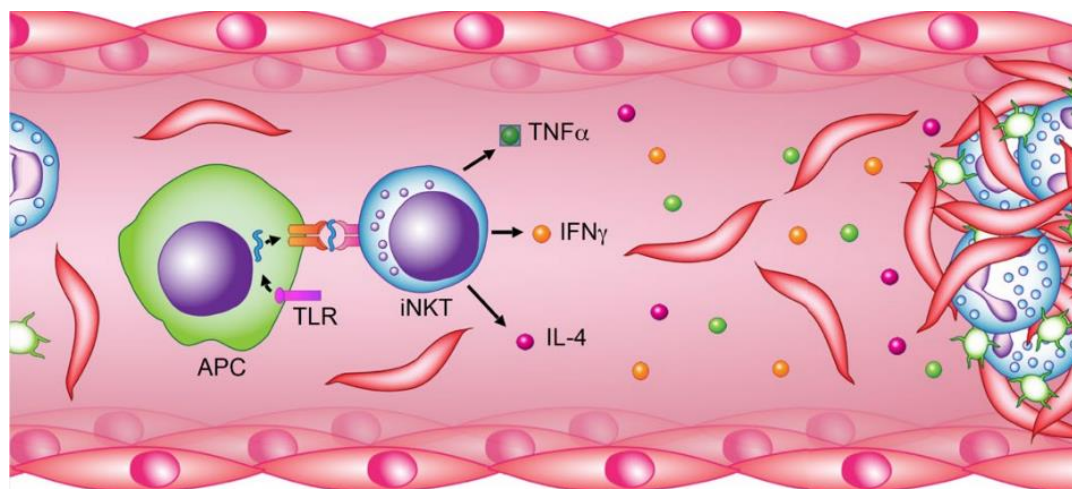
expressam PS, que além de contribuir na adesão celular, aumentam a hemólise, ativam a cascata de coagulação e o endotélio. Hemácias falciformes geram micropartículas que transportam grandes quantidades de hemoglobina, heme e ferro, assim como, induzindo a produção de IL-6, TNF e IL-1 $\beta$  em monócitos, contribuindo com a inflamação (CONRAN; BELCHER, 2018).

A hemólise é um constituinte primário da inflamação na AF. A Hb liberada no plasma provoca o consumo imediato de NO, reduzindo sua biodisponibilidade e resultando em disfunção vascular, indicada pela vasoconstrição, ativação de células endoteliais e plaquetas, observadas pela expressão de P-selectina e integrina  $\alpha$ V $\beta$ 3 ativada. A enzima arginase 1 é outro componente importante liberado na hemólise. Essa enzima compete com a NO sintase pelo substrato L-arginina, reduzindo a produção de NO, acarretando o remodelamento vascular (KATO, et al, 2018). O heme e a Hb livres no plasma atuam como padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs) ativando o sistema imune inato e aumentando a adesão celular com o endotélio, e assim, favorecendo a vaso-oclusão. O heme ativa TLR4, que resulta em componentes inflamatórios como a ativação de NF- $\kappa$ B, produção de citocinas e expressão de moléculas de adesão (KATO, et al, 2018).

A liberação destas citocinas tem um papel importante na fisiopatologia da AF, de forma a contribuir com a gravidade da doença (ALAGBE et al., 2022). Em pacientes com AF, a elevada expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), estão associados com a gravidade da doença e têm pior prognóstico. A figura 6 representa a lesão de isquemia-reperfusão na AF, em que o dano tecidual causado pela vaso-oclusão, seguido de restauração do fluxo sanguíneo nos tecidos, promove a ativação de iNKT e a liberação citocinas como o IFN- $\gamma$ , resultando na inflamação (CONRAN; BELCHER, 2018). Em razão de seus efeitos, o IFN- $\gamma$  tem sido investigado como um modulador da infecção em pacientes com AF (ELALFY et al., 2018; OKONGWU et al., 2018).



Figura 6 – Produção de IFN- $\gamma$  na lesão de isquemia-reperfusão na anemia falciforme.



Fonte: FEATURES, 2023. Legenda: Adesão de hemácias falciformes, plaquetas e leucócitos ao endotélio, causando a vaso-oclusão. O bloqueio do fluxo sanguíneo leva a isquemia e a lesão celular pela ativação de iNKT, induzindo a síntese e liberação de citocinas inflamatórias, dentre elas, o IFN- $\gamma$ . Abreviaturas: Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina 4 (IL-4), Receptor Toll-like (TLR), Célula apresentadora de antígeno (APC), Célula T invariante *natural killer* (iNKT).

O IFN- $\gamma$  é uma citocina que pode atuar como um agente antitumoral ao induzir apoptose em células tumorais por meio da sinalização JAK-STAT 1 (JORGOVANOVIC et al., 2020). No entanto, o IFN- $\gamma$  é relatado como uma das principais citocinas produzidas na inflamação, atuando na ativação de macrófagos, células T e na indução da expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) (JOANNES et al., 2010). Outras funções associadas ao IFN- $\gamma$  são a regulação de células apresentadoras de antígenos, a sinalização da inflamação, bem como a síntese de quimiotáticos e a ativação de leucócitos. O IFN- $\gamma$  tem capacidade de induzir a expressão de IL-12 em macrófagos, regular a geração de NO e ROS, regular a expressão do macrófago pró-inflamatório M1 e do MHC classe I e II, além de suprimir a expressão de IL-10, uma citocina com atividade anti-inflamatória (BURKE; YOUNG, 2019).

Estudos mostram que há uma regulação cruzada entre o IFN- $\gamma$  e a IL-10, em que uma pode interferir na produção da outra. O IFN- $\gamma$  exerce um efeito antagonista em IL-10, por meio da supressão de fatores transcricionais de IL-10, e desta maneira, induzindo a produção de IFN- $\gamma$  e citocinas inflamatórias, como IL-4, IL-5 e TNF (HU et al., 2006; CAVALCANTE et al., 2016; BURKE; YOUNG, 2019).

## 1.5 Polimorfismos

A inflamação tem um papel significativo nas complicações clínicas na AF, porém todas as vias inflamatórias, que desencadeiam esses eventos, não são inteiramente conhecidas. Inúmeros estudos têm avaliado a influência de biomarcadores inflamatórios na AF, entretanto, poucos verificaram a interferência de polimorfismos genéticos em moléculas inflamatórias com a inflamação e o seu envolvimento nas complicações da doença (TOZATTO-MAIO et al., 2020).

Dentre as variações genéticas no DNA, os polimorfismos são os de maior ocorrência na população, com frequência superior a 1%, diferindo das mutações nessa condição. A maior incidência dos polimorfismos sugere que sua ocorrência acontece de forma natural, podendo ter um efeito neutro ou benéfico. Os polimorfismos genéticos além de contribuírem a variação interindividual, tornaram-se ferramentas úteis na identificação de paternidade, no mapeamento de genes de doenças em humanos, em comparações evolutivas de sequências de DNA, dentre outras investigações (SINGH; KULATHINAL, 2013).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) são a forma mais comum de variação do genoma, aparecendo a cada 1000 pares de bases na sequência do DNA, em áreas codificadores (éxons), regiões críticas na regulação da expressão de genes e proteínas, como também em regiões intergênica e não codificantes (íntrons) (SINGH; KULATHINAL, 2013; KARKI et al., 2015; VALLEJOS-VIDAL, et al., 2020). Atualmente, os SNPs estão sendo investigados como biomarcadores no diagnóstico ou prognóstico de várias doenças, em virtude de sua frequência na população e fácil análise, além da possibilidade de genotipagem e da realização de estudos de associações fundamentados com a bioestatística (VALLEJOS-VIDAL, et al., 2020). Estas características atribuíram aos SNPs um importante papel na determinação de associações com condições clínicas complexas e no perfil fenotípico de doenças.

Na AF, evidências têm demonstrado associação de complicações clínicas, como a dor, com a presença de SNPs, porém é necessário que haja mais estudos acerca da prevalência de polimorfismos em genes capazes de alterar o fenótipo da doença (JHUN et al., 2015; GEHLING et al., 2023). A expressão elevada de genes relacionados com a inflamação, metabolismo do heme e formação de ROS foi observada em células do sistema mononuclear de pacientes com AF. Estudos com estes pacientes evidenciaram a associação de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) com crises do sequestro esplênico e com o risco de desenvolver AVC, como também a relação de polimorfismos no gene do fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) com úlceras de membros inferiores e AVC. Os polimorfismos no gene da haptoglobina (Hp), uma glicoproteína responsável por remover Hb livre da circulação,

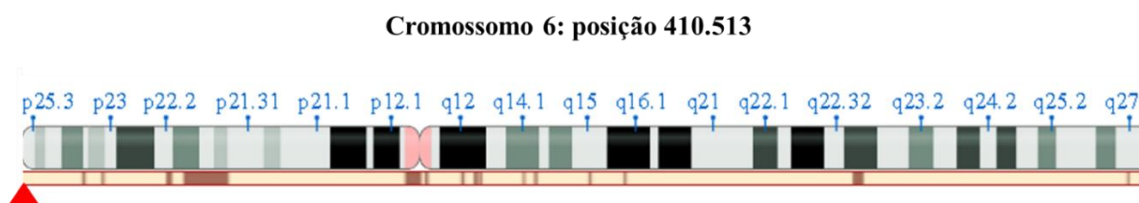
afetam a sua capacidade funcional, resultado na formação de ROS e no dano endotelial (CAVALCANTE et al., 2016; GILLI et al., 2016; EDWARDS et al., 2022). Baseado nesses achados, a relação do processo inflamatório com a genética pode contribuir na modulação da AF, de forma a esclarecer os diferentes fenótipos da doença (GILLI et al., 2016).

### 1.5.1 Polimorfismo no fator regulador de interferon 4 (IRF4)

Foi demonstrado que polimorfismos em fatores reguladores de interferon (IRF) estão associados com a inflamação e a síntese de interferons (MOSAYYEBI et al., 2020). Os IRFs compõem uma família de nove fatores de transcrição, envolvidos na regulação de respostas imunes e inflamatórias (SOUSA, 2015; NEGISHI; TANIGUCHI; YANAI, 2017). Dentre estes fatores, tem-se o fator regulador de interferon 4 (IRF4), que atua na diferenciação e maturação de células hematológicas e nos processos imunológicos, cuja expressão é restrita a linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas (GUARDA et al., 2019; MERLI et al., 2021).

Estudos acerca do gene de IRF4, localizado na ponta do braço curto do cromossomo 6 (6p25.3) (Figura 7) identificaram polimorfismos intrônicos associados com diversas condições como na altura de indivíduos, a cor da pele e de cabelos, como também ao risco de desenvolver doenças, como o melanoma, doença celíaca e leucemias, ao prognóstico e à resposta ao tratamento na leucemia mieloide crônica (GATHANY et al., 2009; DO et al., 2010; WARD, 2020).

Figura 7 - Representação esquemática da localização do gene de IRF4 no cromossomo 6.



Fonte: Adaptado de NCBI, 2023. Legenda: a figura mostra a localização do gene de IRF4 na ponta do braço curto do cromossomo 6 (seta em vermelho) na banda cromossômica p25.3. Abreviatura: IRF4, fator regulador de interferon 4.

Entretanto, foi identificado que uma mutação no gene IRF4 em crianças com linfoma de células B, favoreceu um bom prognóstico (JIANG et al., 2023; TARANTINI et al., 2022). Uma vez que o IRF4 está envolvido na regulação de etapas da diferenciação celular, outros estudos têm demonstrado uma correlação negativa do polimorfismo na região

rs12203592 como fator de risco para o desenvolvimento de câncer de pele, e também, como possível determinante da suscetibilidade de pacientes transplantados à aspergilose invasiva, enquanto polimorfismo em rs1877176 pode estar associado ao risco de leucemia por alterar o sítio de interação de microRNAs com transcritos alvo, e dessa forma, desregular a diferenciação de células hematopoiéticas (DZIKIEWICZ-KRAWCZYK et al., 2014; WANG et al., 2014; LUPIAÑEZ et al., 2016).

Na literatura, não há dados envolvendo IRF4 na AF. Entretanto, em virtude da investigação de polimorfismos no gene IRF4 em doenças hematológicas, no nosso grupo, um estudo identificou uma associação do polimorfismo deste gene na região rs12203592 com complicações clínicas na AF, resultando no pior prognóstico da doença. Contudo, como citado anteriormente, as vias inflamatórias envolvidas nas complicações clínicas na AF não estão completamente estabelecidas, e dada a associação do gene IRF4 com a inflamação, um maior conhecimento acerca da relação de polimorfismos intrônicos deste gene com a doença, contribuiria na investigação de biomarcadores para prever complicações, bem como a desenvolver terapias direcionadas.

O *doppler* transcraniano convencional (TCD), uma ferramenta importante no rastreio e prevenção do desenvolvimento de AVC em crianças com AF, é utilizado para a triagem de risco de AVC, porém, não apresenta especificidade em adulto, e diante dessa limitação, estudos estão sendo realizados com a finalidade de desenvolver biomarcadores para a previsão de AVC em todos os pacientes com AF (VERDUZCO; NATHAN, 2009; FLANAGAN et al., 2011; TALAHMA; STRBIAN; SUNDARARAJAN, 2014). E nesse contexto se faz necessário a investigação da influência de moduladores genéticos como biomarcadores preditivos das complicações clínicas na AF, bem como na estratégia terapêutica da doença.

O estudo do polimorfismo dos IRF na AF é inovador, porém se justifica pelo fato deste modular o processo inflamatório, condição essa presente de forma sistêmica na doença. Logo, o presente estudo se propôs a investigar a associação de polimorfismo no gene de IRF4 na região rs1877176 com as complicações clínicas e com os biomarcadores de inflamação e hemólise, como um potencial biomarcador nos desfechos clínicos em pacientes com AF.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar a influência do polimorfismo do fator regulador de interferon 4 (IRF4) na região rs1877176 com a clínica e o perfil sérico do interferon gama (IFN- $\gamma$ ) em pacientes com anemia falciforme.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar as frequências alélicas e genotípicas resultantes do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 em pacientes com AF e no grupo controle;
- Associar o polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 com as principais complicações clínicas dos pacientes com AF;
- Relacionar o polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 com os parâmetros laboratoriais dos pacientes com AF;
- Avaliar os níveis séricos de IFN- $\gamma$  nos pacientes com AF e no grupo controle;
- Relacionar o polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 com os níveis séricos de IFN- $\gamma$  em pacientes com AF com e sem o uso de hidroxiurea.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa que Envolve Seres Humanos do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) sob o número de aprovação 6.185.474, sendo conduzido conforme a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

#### **3.2 Delineamento do estudo**

Trata-se de um estudo transversal e analítico, composto por pacientes com anemia falciforme, acompanhados no Ambulatório de Hemoglobinopatias do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

#### **3.3 Local do estudo**

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Hemoglobinopatias e Genética de Doenças Hematológicas (LPHGDH) e no de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) em parceria com o Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC), ambos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

#### **3.4 Casuística**

A seleção das amostras para o estudo ocorreu através da amostragem por conveniência, em que foram incluídos 72 pacientes adultos com diagnóstico clínico e laboratorial de AF, de ambos os sexos, acompanhados no HEMOCE. O grupo controle incluiu 85 doadores de sangue saudáveis do HEMOCE. Os pacientes com AF foram estratificados conforme:

- O grau da anemia em: anemia leve ( $Hb \geq 8g/dL$ ) e anemia moderada ou grave ( $Hb < 8g/dL$ ) (ABAN et al., 2017);
- O uso ou não de HU;

- Complicações clínicas: crise álgica, AVC, STA, osteomielite, infecções recorrentes, alterações renais, doenças cardíacas, hepatomegalia, colelitíase e úlcera de perna (ADEWOYIN, 2015).

### **3.5 Seleção da amostra**

#### **3.5.1 Critérios de inclusão e exclusão**

O estudo incluiu pacientes adultos, com idade superior a 18 anos, com diagnóstico clínico e molecular de AF confirmado, em estado estacionário segundo os critérios de Ballas (2011): ausência de crises dolorosas nas últimas quatro semanas, não ter sido hospitalizado a pelo menos 3 dias, ausência de transfusões sanguíneas nos últimos quatro meses, ausência de quadros infecciosos ou inflamatórios nas últimas quatro semanas e não ter utilizado antibióticos nas últimas três semanas. Pacientes em período gestacional ou com outras doenças hematológicas foram excluídos do estudo.

O grupo controle incluiu indivíduos adultos, de ambos os sexos, doadores voluntários no HEMOCE.

### **3.6 Coleta de dados**

Foram coletadas em prontuários e analisadas as seguintes variáveis: características sociodemográficas (idade, sexo, cidade), dados laboratoriais (HbS, HbF, HbA<sub>2</sub>, hemograma, contagem de reticulócitos, LDH, bilirrubina indireta, AST) e dados clínicos quanto ao uso de HU e as complicações (crise de álgica, AVC, STA, osteomielite, infecções recorrentes, alterações renais, doenças cardíacas, hepatomegalia, colelitíase e úlcera de perna).

Foram coletados 4 mL de amostras de sangue periférico em dois tubos, contendo EDTA, para análise do polimorfismo, e em gel separador para a dosagem de IFN- $\gamma$ , dos pacientes com AF e dos indivíduos do grupo controle. As amostras foram fracionadas e armazenadas em *ultrafreezer* a -80°C para posterior análise.

### **3.7 Análise laboratorial**

#### **3.7.1 Dosagem de IFN- $\gamma$**

O ensaio de imun absorção enzimática (ELISA) foi utilizado a fim de dosar os níveis séricos de IFN- $\gamma$ , fazendo o uso do kit *Human IFN-gamma* DuoSet ELISA (cat. n. DY285B; R&D Systems, Inc. a Bio-Techne Brand, Minneapolis, EUA), seguindo as etapas descritas para o procedimento.

### 3.7.2 *Extração e quantificação do DNA*

Um volume de 400uL de cada amostra de sangue total foi adicionado em microtubos, onde foi adicionado 800uL de SDH (solução de lise). Em seguida, essas amostras foram homogeneizadas em vórtex por 30 segundos e centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante dessas amostras foi descartado, e ao *pellet* formado contendo leucócitos, adicionou-se 250uL de PBS e 750uL de Trizol<sup>®</sup> LS Reagent (Life Technologies, California, EUA). As amostras foram armazenadas por 1h em *ultrafreezer* com temperatura de -80°C.

Após esse período, adicionou-se 200uL de clorofórmio, agitando as amostras em vórtex durante 15 segundos, mantendo-as em repouso por 3 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 25 minutos a 5000 rpm a 4°C. Posteriormente, acrescentou-se 500uL de BEB (*Back Extraction Buffer*), agitando-as em vórtex por 1 minuto e incubando-as a 25°C por 30 minutos. Logo após, as amostras foram centrifugadas novamente a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C, em seguida, o sobrenadante de cada uma foi transferido para outro microtubo, onde foi adicionado 400uL de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas por 1h a -20°C. Em seguida, centrifugadas durante 30 minutos a 1400 rpm na temperatura de 4°C. O sobrenadante de cada amostra foi descartado, o *pellet* formado foi lavado com 100uL de etanol absoluto gelado, levemente homogeneizado e centrifugado durante 15 minutos a 1400 rpm a 4°C. Esse processo foi repetido por mais duas vezes, e após a última lavagem, os sobrenadantes foram descartados.

Os microtubos contendo o DNA ficaram secando a temperatura ambiente, e depois, adicionou-se água livre de DNase para serem quantificados por espectrofotometria (Nanodrop - Thermo Scientific<sup>®</sup>, Massachusetts, EUA), onde verificou-se a relação DNA/ proteínas por meio da razão de absorbâncias a 260/280nm para avaliar a integridade e qualidade do DNA extraído. As amostras que apresentaram uma razão entre 1,7 e 2,0 foram consideradas adequadas para o estudo.

### 3.7.3 *Análise do polimorfismo do gene de IRF4*



A análise do polimorfismo rs1877176 (A/G) do gene de IRF4 foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), utilizando a sonda TaqMan<sup>®</sup> *genotyping assay* (AppliedBiosystems, Thermo Scientific<sup>®</sup>, Massachusetts, EUA) e o equipamento termociclador (CFX96 Real-time System – BioRad, California, EUA). O polimorfismo rs1877176 foi detectado utilizando a sonda (CAGTGAAATGAGCAGCCCTTACAGT[A/G]TTGTTACCACCAAGGGCAGGTAGGT) em que o alelo A estava marcado pelo fluoróforo VIC (cor verde) e o alelo G marcado pelo fluoróforo FAM (cor azul).

A presença dos fluoróforos emitem fluorescência no decorrer da PCR, indicando o tipo de alelo presente na amostra em homozigose ou heterozigose, permitindo a genotipagem dos polimorfismos. Para cada reação, utilizou-se 5,0µL de TaqMan Universal PCR Master Mix, 2,75µL de água ultrapura, 0,25µL da sonda TaqMan *genotyping assay* e 2,0 µL de DNA da amostra (aproximadamente 20 ng/µL). As amostras foram analisadas no termociclador com as seguintes condições: incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos (ativação da DNA polimerase), seguidos por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60° por 1 minuto (anelamento e extensão).

### 3.8 Análise estatística

Os dados coletados foram organizados em planilha no programa Microsoft<sup>®</sup> Excel (2019). A análise estatística foi feita utilizando os programas SPSS<sup>®</sup> *Statistic* versão 22 (IBM Corporation) e o *GraphPad Prism*<sup>®</sup> 6.01 (*GraphPad Software*). As frequências alélicas e genotípicas foram avaliadas conforme o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e os resultados testados pelo teste qui-quadrado no software SPSS. Os testes exato de Fisher e qui-quadrado foram utilizados para verificar a associação entre as variáveis qualitativas. A normalidade das variáveis quantitativas foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. As variáveis foram apresentadas como frequência absoluta, porcentagem, média, desvio padrão e mediana. As comparações foram realizadas pela ANOVA One-way com pós teste de Bonferroni para distribuições normais e teste de Mann-Whitney e teste de Kruskal-Wallis para as distribuições não normais. O nível de significância adotado no presente estudo foi  $p < 0,05$ .

#### 4 RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os dados coletados para as variáveis sociodemográficas, laboratoriais e clínicas para os pacientes com AF e grupo controle. A idade média dos pacientes foi de 32 anos e 73,6% deles utilizavam HU. Os pacientes com AF apresentaram índices hematológicos compatíveis com o estado estacionário da doença, com média da hemoglobina de  $9,23 \pm 1,57$  g/dL e HbF de  $16,91 \pm 7,76$  (%). Contudo, observou-se diferenças significativas com relação ao sexo, hemograma, leucócitos, neutrófilos e plaquetas ( $p < 0,0001$ ). Houve prevalência dos pacientes do sexo feminino (62,5%). Os valores das hemácias, hemoglobina e neutrófilos dos pacientes foram menores em relação ao dos controles, entretanto os índices hematimétricos VCM e HCM, como também, leucócitos e plaquetas foram elevados.

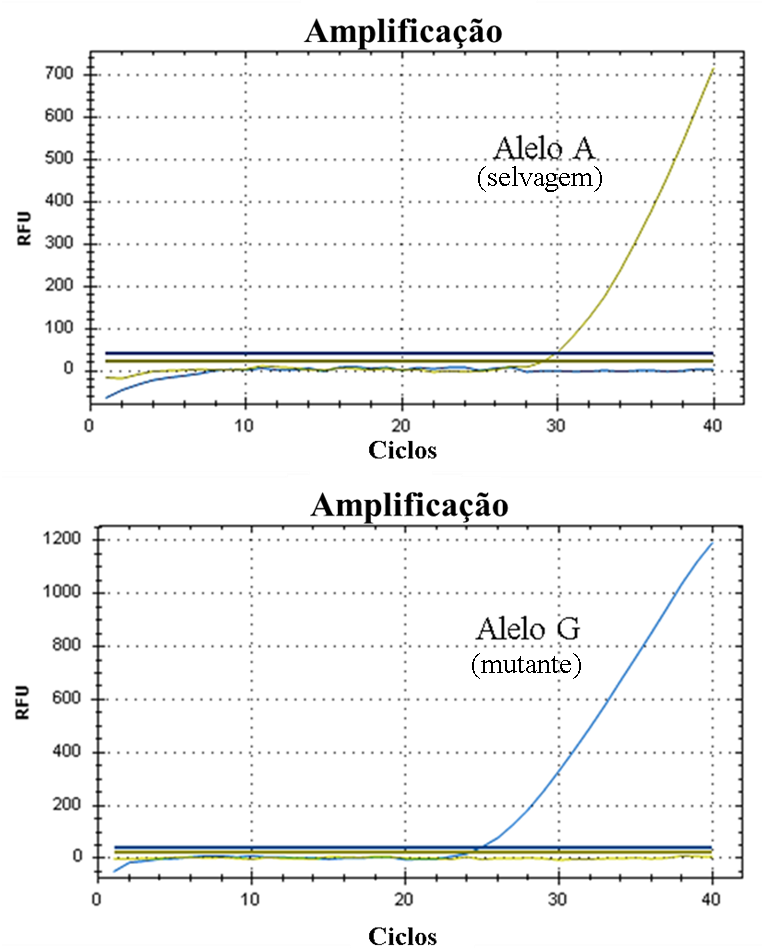
Tabela 1- Dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais e de pacientes com AF (HbSS) (n = 72) e do grupo controle (HbAA) (n = 85).

Variáveis	Média ± DP		p
	AF	Controle	
Masculino/Feminino	27/45	66/21	-
Idade (anos)	32 ± 11,3	34 ± 12,1	-
Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )	2,42 ± 0,50	4,7 ± 0,46	<0,0001
Hemoglobina (g/dL)	9,23 ± 1,57	14,7 ± 1,3	<0,0001
Hematócrito (%)	26,7 ± 4,64	42,4 ± 3,4	<0,0001
VCM (fL)	110,5 ± 17,8	89,8 ± 4,2	<0,0001
HCM (pg)	38,7 ± 4,5	31,2 ± 1,8	<0,0001
CHCM (g/dL)	34,6 ± 1,50	34,84 ± 1,22	0,4085
Leucócitos ( $/\text{mm}^3$ )	9812 ± 3548	7110 ± 2076	<0,0001
Neutrófilos ( $/\text{mm}^3$ )	5018 ± 2537	5878 ± 910	<0,0001
Plaquetas ( $/\text{mm}^3$ )	352183 ± 97504	213507 ± 55484	<0,0001
HbA <sub>2</sub> (%)	3,34 ± 0,60	NA	NA
HbF (%)	16,91 ± 7,76	NA	NA
HbS (%)	78,97 ± 10,14	NA	NA
Terapia com hidroxiureia (n)	53	NA	NA

Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: anemia falciforme (AF), hemoglobina fetal (HbF), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), não se aplica (NA), desvio padrão (DP).

O resultado da amplificação da qPCR está representada na figura 8. Os genótipos foram identificados pelo *CFX Manager™ Software* para posterior análises.

Figura 8 - Genotipagem do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 pela reação em cadeia da polimerase em tempo real, utilizando sistema TaqMan®.



Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: Sonda TaqMan® marcada com fluoróforo VIC (verde) identificando o alelo A (alelo selvagem) e pelo fluoróforo FAM (azul), identificando o alelo G (alelo mutante). RFU (unidade de fluorescência).

As frequências alélicas e genóticas do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 para os grupos pacientes com AF e controles estão representadas na Tabela 2. A frequência do alelo G (mutante) foi de 80,6% nos pacientes com AF e 72,4% no grupo controles, enquanto o alelo A (selvagem), teve uma frequência 19,4% nos pacientes e 27,6% para os controles. Não houve diferenças entre os valores das frequências observadas e esperadas, não havendo associação entre esses resultados. Logo, as amostras pertencem a uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ).

Tabela 2 - Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo no gene IRF4 na região rs1877176 nos grupos pacientes com AF e controle.

Polimorfismo do gene IRF4 rs1877176	AF, n (%)	Controles, n (%)	<i>p</i>
<b>Frequência alélica</b>			
Alelo A	28 (19,4)	47 (27,6)	>0,05
Alelo G	144 (80,5)	123 (72,3)	
<b>Frequência genotípica</b>			
Genótipo AA	2 (2,8)	10 (11,8)	0,226
Genótipo AG	24 (33,3)	27 (31,8)	
Genótipo GG	46 (63,9)	48 (51,1)	

Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: anemia falciforme (AF), Alelo A (alelo selvagem), Alelo G (alelo mutante), homocigoto selvagem (AA), heterocigoto (AG), homocigoto mutante (GG). Teste do qui-quadrado,  $p > 0,05$ .

Quanto as frequências genótípicas, os genótipos dos pacientes com AF e do grupo controle foram associadas (Tabela 2), obtendo-se os seguintes resultados: 2,8% para o genótipo AA (homocigoto selvagem), 33,3% para o genótipo AG (heterocigoto) e 63,9% para o genótipo GG (homocigoto mutante), e para o grupo controle foram 11,8% para o genótipo AA, 31,8% para o genótipo AG e 51,1% para o genótipo GG. Observou-se que o genótipo GG foi o mais frequente nos participantes de ambos os grupos, e que nenhuma associação significativa foi observada em relação ao polimorfismo nos grupos com e sem a doença ( $p > 0,226$ ).

A Tabela 3 mostra os resultados da associação dos genótipos e da frequência alélica do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 com as complicações clínicas da AF. Observou-se que houve uma associação entre a variável AVC e o polimorfismo ( $p=0,020$ ). O risco de pacientes com AF em desenvolver o AVC foi maior com o genótipo AA (100%). Em relação a frequência alélica, os pacientes com o alelo G tiveram menor risco de desenvolver o AVC ( $p=0,0469$ ). Com relação as demais variáveis clínicas, não houve diferenças em relação aos genótipos e com as frequências alélicas.

Tabela 3 - Associação entre as complicações clínicas, os genótipos e a frequência alélica do polimorfismo no gene IRF4 na região rs1877176 em pacientes com AF (n= 72).

Complicações Clínicas	Genótipos, n (%)				Frequência alélica (%)		
	AA	AG	GG	P	Alelo A	Alelo G	p
<b>Crise Alélicas</b>							
Sim	0 (0)	5 (20,8)	11 (23,9)	1,000	16	21	0,3625
Não	2 (100)	19 (79,2)	35 (76,1)		84	79	
<b>AVC</b>							
Sim	2 (100) <sup>a</sup>	2 (8,3) <sup>b</sup>	6 (13) <sup>b</sup>	0,020*	30	18	0,0469*
Não	0 (0) <sup>a</sup>	22 (91,7) <sup>b</sup>	40 (87) <sup>b</sup>		70	82	
<b>STA</b>							
Sim	1 (50)	11 (45,8)	12 (26,1)	0,210	27	16	0,0583
Não	1 (50)	13 (54,2)	34 (73,9)		73	84	
<b>Alterações renais</b>							
Sim	1 (50)	8 (33,3)	15 (32,6)	1,00	21	19	0,7237
Não	1 (50)	16 (66,7)	31 (64,6)		79	81	
<b>Doença cardíaca</b>							
Sim	1 (50)	13 (54,2)	20 (43,5)	0,725	22	17	0,3722
Não	1 (50)	11 (45,8)	26 (56,5)		78	83	
<b>Hepatomegalia</b>							
Sim	1 (50)	11 (45,8)	24 (52,2)	0,899	18	21	0,5924
Não	1 (50)	13 (54,2)	22 (47,8)		82	79	
<b>Colelitíase</b>							
Sim	1 (50)	13 (54,2)	27 (58,7)	0,901	18	21	0,5924
Não	1 (50)	11 (45,8)	19 (41,3)		82	79	
<b>Osteomielite</b>							
Sim	0 (0)	1 (4,2)	2 (4,3)	1,000	17	20	0,5849
Não	2 (100)	23 (95,8)	44 (95,7)		83	80	
<b>Infecções recorrentes</b>							
Sim	0 (0)	6 (25)	16 (34,8)	0,446	14	22	0,1409
Não	2 (100)	18 (75)	30 (65,2)		86	78	
<b>Úlcera de membros inferiores</b>							
Sim	1 (50)	11 (45,8)	12 (26,1)	0,210	27	16	0,0583
Não	1 (50)	13 (54,2)	34 (73,9)		73	84	

Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: anemia falciforme (AF), homocigoto selvagem (AA), heterocigoto (AG), homocigoto mutante (GG), síndrome torácica aguda (STA), acidente vascular cerebral (AVC). \*Teste qui-quadrado  $p > 0,05$ . As letras minúsculas sobrescritas indicam diferenças estatísticas entre os genótipos para a variável AVC. Pacientes com o genótipo AA tem o maior risco de desenvolver o AVC<sup>a</sup>. A presença do alelo G confere proteção contra o risco de AVC<sup>b,c</sup>.

A variáveis do hemograma e marcadores de hemólise foram comparadas em relação aos genótipos do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 e os resultados apresentados na Tabela 4. Quanto ao perfil das hemoglobinas, os resultados foram semelhantes entre os três genótipos. A HbS teve um percentual próximo da faixa de 80 a 90%, a HbF mostrou um valor acima de 15% e a e HbA<sub>2</sub> apresentou resultado menor que 3,5%. Considerando o valor da Hb, o grau da anemia foi leve. O VCM foi elevado nos três genótipos e os leucócitos, neutrófilos e plaquetas apresentaram valores aproximados e dentro da

normalidade em relação aos genótipos. No entanto, quanto aos marcadores de hemólise reticulócitos e a LDH, estes estavam elevados nos três genótipos, e a AST e BI tiveram aumento para o genótipo GG. No entanto, mesmo diante dessas observações, não foram encontradas diferenças significativas.

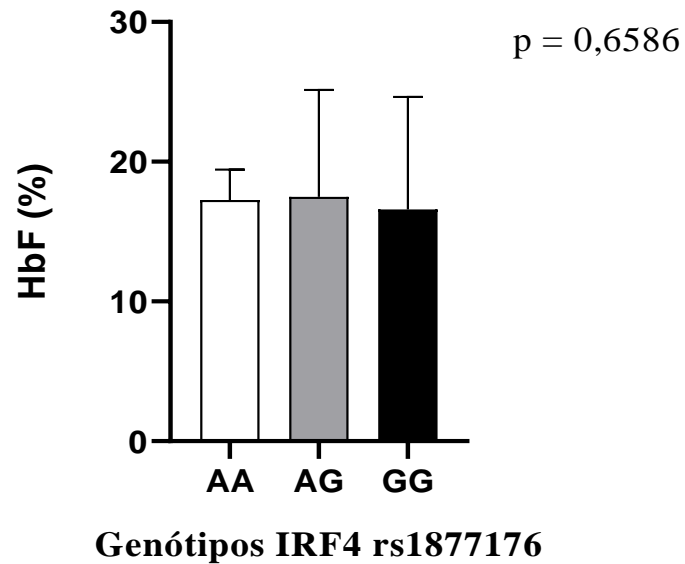
Tabela 4 - Relação entre os parâmetros laboratoriais (hemograma e marcadores de hemólise) e os genótipos do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 em pacientes com AF.

Parâmetros laboratoriais	Genótipos (Média ± DP)			p
	AA	AG	GG	
HbF (%)	17,25 ± 2,19	17,48 ± 7,65	16,60 ± 8,04	0,6586
HbS (%)	78,40 ± 0,42	80,38 ± 7,77	78,25 ± 11,39	0,6912
HbA <sub>2</sub> (%)	3,0 ± 0,42	3,3 ± 0,65	3,3 ± 0,58	0,6409
Hemoglobina (g/dL)	9,8 ± 0,98	9,4 ± 1,77	9,1 ± 1,49	0,7186
Hematócrito (%)	28,4 ± 2,89	27,2 ± 5,08	26,3 ± 4,48	0,6669
VCM (fL)	123,7 ± 12,60	110,5 ± 24,93	109,8 ± 13,07	0,2262
HCM (pg)	42,6 ± 4,29	39,4 ± 4,19	38,1 ± 4,71	0,2280
CHCM (g/dL)	34,4 ± 0,05	34,5 ± 1,47	34,7 ± 1,55	0,8208
Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	8678 ± 4557	9520 ± 3528	10015 ± 3592	0,7227
Neutrófilos (mm <sup>3</sup> )	4500 ± 2893	5035 ± 2800	5031 ± 2438	0,9313
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	389600 ± 146937	360304 ± 119956	346320 ± 83863	0,9015
Reticulócitos (/mm <sup>3</sup> )	244570 ± 79578	239059 ± 79019	228161 ± 84910	0,7923
AST (U/L)	38,5 ± 2,12	43,2 ± 15,65	47,6 ± 23,91	0,9537
BI (mg/dL)	1,05 ± 1,05	2,34 ± 2,36	2,42 ± 2,42	0,3021
LDH (U/L)	874 ± 84,85	818,5 ± 295,3	760,4 ± 314,4	0,5061

Legenda: anemia falciforme (AF), hemoglobina fetal (HbF), hemoglobina S (HbS), hemoglobina A (HbA<sub>2</sub>), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), aspartato aminotransferase (AST); bilirrubina indireta (BI), lactato desidrogenase (LDH), homozigoto selvagem (AA), heterozigoto (AG), homozigoto mutante (GG). Teste Anova One-way com pós-teste de Bonferroni para as variáveis com distribuição normal ou Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's para as variáveis com distribuição não normal.

Comparando-se as concentrações de HbF em relação ao polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 nos pacientes com AF, observou-se que os pacientes com o genótipo AG tiveram concentração de HbF um pouco maior em relação aos outros genótipos, contudo, essa diferença não foi considerada significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 9).

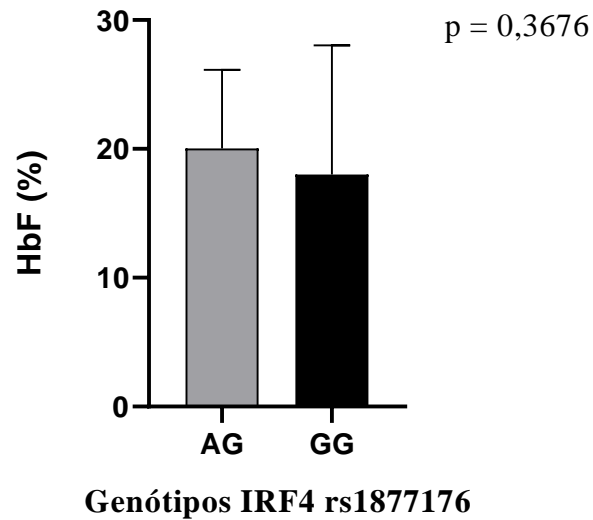
Figura 9 - Comparação entre as concentrações de hemoglobina fetal (HbF) entre os genótipos do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 em pacientes com AF.



Legenda: Fator regulador de interferon 4 (IRF4), homocigoto selvagem (AA), heterocigoto (AG), homocigoto mutante (GG). Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's,  $p=0,6586$ .

Devido ao efeito da HU na modulação da HbF, os pacientes com AF foram estratificados conforme o uso e o não de HU, de forma a avaliar a influência do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 apenas naqueles pacientes que não utilizavam o fármaco (Figura 10). Portanto, havia apenas pacientes com os genótipos AG e GG e a associação entre estes genótipos e a concentração de HbF não demonstrou diferença significativa.

Figura 10 - Associação da concentração de HbF (%) com os genótipos AG e GG do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 em pacientes com AF sem o uso de HU.

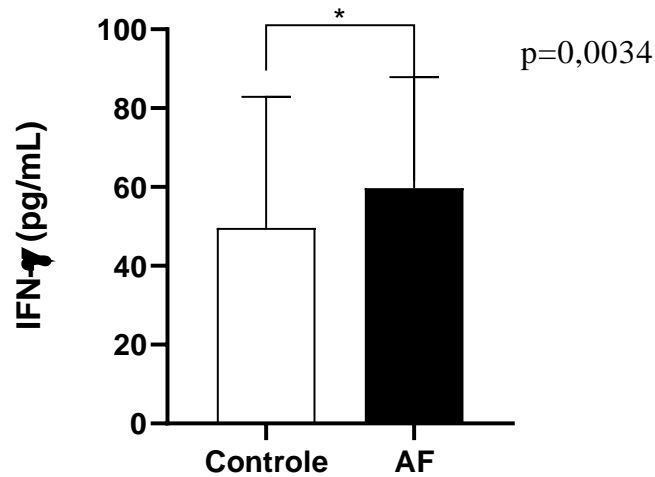


Legenda: Fator regulador de interferon 4 (IRF4), heterozigoto (AG), homozigoto mutante (GG), hemoglobina fetal (HbF), hidroxiureia (HU). Teste exato de Fisher,  $p=0,3676$ .

Avaliou-se os níveis séricos de IFN- $\gamma$  entre os grupos pacientes e controles por meio do teste Mann-Whitney (Figura 11). Esse resultado mostrou um aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  nos pacientes com AF, constatando com a presença da inflamação crônica ( $p=0,0034$ ).



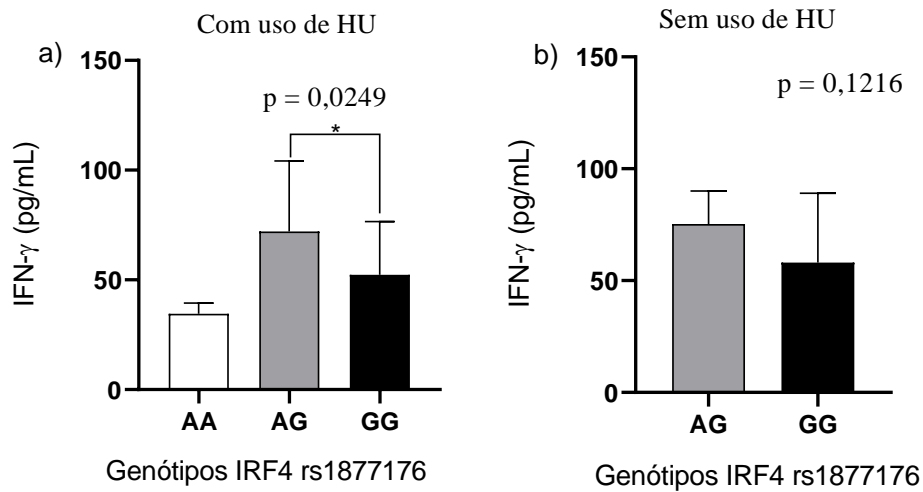
Figura 11 – Comparação dos níveis séricos de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) entre os grupos pacientes com AF e controle.



Legenda: O gráfico revela a diferença no perfil sérico do IFN- $\gamma$  entre pacientes e controles, demonstrando o estado inflamatório crônico na anemia falciforme. \* Teste Mann-Whitney,  $p=0,0034$ .

Devido ao destaque do IFN-  $\gamma$  como um marcador da inflamação nos pacientes com AF, verificou-se a associação dessa citocina com o polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 dentro do grupo pacientes com AF com e sem o uso de HU. Observa-se na figura 12a que houve uma diferença significativa dos níveis séricos de IFN-  $\gamma$  entre os genótipos AG e GG ( $p=0,0249$ ) nos pacientes que utilizaram HU. Com relação aos pacientes que não utilizaram HU (Figura 12b), é possível observar que houve diminuição da concentração de IFN-  $\gamma$  em relação ao genótipo GG. Logo, a presença do alelo G (mutante) em homozigose, atua na diminuição dos níveis de IFN-  $\gamma$ , com potencial de reduzir o estado inflamatório crônico na AF.

Figura 12 - Associação dos genótipos do polimorfismo do gene do fator regulador de interferon 4 (IRF4) na região rs1877176 com os níveis séricos de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) em pacientes com AF com e sem o uso de hidroxiureia (HU).



Legenda: Pacientes com anemia falciforme (AF) foram estratificados com e sem o uso de hidroxiureia (HU). Na figura 12a, observa-se diferença significativa entre os genótipos AG e GG, onde o alelo G, em homozigose, reduziu os níveis séricos de IFN- $\gamma$  na presença de HU. No entanto, não foi observada associação significativa no perfil de IFN- $\gamma$  sem o uso de HU na figura 12b. Homozigoto selvagem (AA), heterozigoto (AG), homozigoto mutante (GG). \*Teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's,  $p > 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, verificou-se um predomínio do sexo feminino e da idade média de 32 anos nos pacientes com AF. Resultado esse que corroborou com os obtidos em outros estudos (CRUZ et al., 2016; SARAT et al., 2019). No entanto, Thomson e colaboradores (2023) encontraram uma prevalência semelhante os sexos em pacientes adultos com AF. A não diferença entre a prevalência entre os sexos na doença se deve ao fato da mesma não apresentar alteração genética ligada ao cromossomo sexual, mas sim uma alteração autossômica recessiva no gene da beta globina (CRUZ et al., 2016).

Na determinação das frequências alélica e genotípica do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176, o presente estudo mostrou uma maior prevalência do alelo G e do genótipo GG nos pacientes com AF e nos controles, portanto não havendo diferença entre o perfil genotípico do referido polimorfismo na população com e sem a doença. A literatura acerca da frequência desse polimorfismo é escassa, não sendo possível encontrar dados da mesma na população portadora de AF. No entanto, mecanismos envolvendo polimorfismos no gene IRF4 em associação com diferentes doenças, de caráter hematológicas ou não, podem ajudar a formular hipóteses ou a esclarecer como o polimorfismo na região rs1877176 contribui na modulação das complicações clínicas e no perfil inflamatório na AF.

Em relação a associação do polimorfismo no gene IRF4 na região rs1877176 com as complicações clínicas na AF, foi observado uma associação com o AVC. Wang e colaboradores (2021) realizaram uma metanálise de estudos com polimorfismos no gene IRF4 nas regiões rs12203592 (C/T), rs62389423 (G/A). O grupo demonstrou que estes polimorfismos estavam associados com o maior risco de desenvolver melanoma, síndrome mielodisplásica (SMD) e da leucemia mieloide aguda (LMA). Um outro estudo verificou que o polimorfismo do gene IRF4 em rs872071 (A/G) foi fator de risco para desenvolver leucemia linfocítica crônica e linfoma de Hodgkin (BRODERICK et al., 2010). Tarantini e colaboradores (2022) avaliaram o impacto da expressão gênica do IRF4 na resposta molecular aos inibidores de tirosina quinase em pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC), demonstrando que o aumento da expressão gênica do IRF4 ao diagnóstico e aos 3 meses de tratamento conferiu remissão molecular preditiva. Jiang e colaboradores (2023) sugeriram que uma mutação no gene do IRF4 pode estar relacionada com o bom prognóstico de linfoma de grandes células. Embora o estudo de Tarantini e colaboradores (2022) seja avaliando a expressão e não o polimorfismo do gene IRF4 em doença hematológica neoplásica, o mesmo contribui de forma indireta para investigar a função do polimorfismo do gene IRF4 na patogênese e na resposta ao

tratamento em pacientes com AF. Portanto, o presente estudo é inovador e impulsiona para novas pesquisas.

Destaca-se portanto que no presente estudo verificou-se que o alelo G do polimorfismo do IRF4 (rs1877176), confere proteção contra o risco de AVC. O AVC é uma das principais causas de morbimortalidade na doença e sua fisiopatologia também está associada com polimorfismos que podem atuar na disfunção do endotélio, bem como, na coagulação e processos inflamatórios, e desta forma, causando vasculopatia cerebral com estenose de importantes vasos cerebrais como as artérias e carótida (FAROOQ; TESTAI, 2019; LOGGETTO et al., 2022). Um estudo realizado com o polimorfismo no gene TNF- $\alpha$ , uma citocina associada a inflamação, revelou um efeito protetor do alelo A (mutante) com o risco de desenvolver AVC em pacientes com AF. Este estudo também demonstrou que o alelo G (selvagem) do polimorfismo do gene TNF- $\alpha$ , quando em homozigose, apresentou risco três vezes aumentado para o desenvolvimento de AVC (HOPPE et al., 2007) Taylor VI e colaboradores (2002) em um estudo piloto com o polimorfismo no gene VCAM1, na região rs3783613 (G>C), identificaram que tanto a presença do alelo C (mutante), como também, do genótipo homozigoto mutante (CC) tiveram efeito protetor contra o risco de AVC, em crianças com AF e que a presença do genótipo CC reduziu a prevalência do AVC em 65% desses pacientes. Polimorfismos podem estar associados entre si, de modo a modular o risco de AVC. Hoppe e colaboradores (2004) avaliando o efeito sinérgico em vias pró-inflamatórias, identificaram interação significativa entre os polimorfismos do receptor de interleucina 4 (IL4R) e TNF- $\alpha$ , onde o genótipo de IL4R para o risco de AVC combinado com o genótipo selvagem de TNF- $\alpha$ , elevou em 5,5 vezes a chance de crianças com AF desenvolverem AVC. A literatura reporta diversos trabalhos na busca de biomarcadores genéticos para o risco ou proteção de AVC, tanto na população pediátrica como adulta com AF. Destaca-se que o AVC é uma das principais causas de óbito na AF. A incidência de AVC isquêmico é de 54% de em pacientes adultos maiores de 30 anos com AF e de AVC hemorrágico, em uma menor proporção, acometendo pacientes com idade de 20 a 30 anos (VERDUZCO; NATHAN, 2009; FOX et al., 2022). Portanto, é necessário que haja, da mesma forma, a investigação de moduladores genéticos nessa população, a fim de estabelecer biomarcadores genéticos que previnam o AVC em todos os pacientes com AF.

A identificação de polimorfismos genéticos que possam modular parâmetros laboratoriais na AF também é útil para o monitoramento da gravidade da doença, todavia no presente estudo, não foi encontrada associação dos biomarcadores laboratoriais com os genótipos do polimorfismo do IRF-4. Momodu e Yusuf (2018) demonstraram que o percentual

de HbS acima de 78% aumenta o risco de complicações clínicas como AVC e STA em pacientes com AF. O resultado do perfil eletroforético dos pacientes em estudo demonstrou que para a HbA<sub>2</sub>, o valor médio foi acima dos valores de referência (2,0 – 3,3%). Resultado corrobora com a literatura que atribui ao método utilizado bem como a possibilidade da coexistência com a beta talassemia, sendo necessário a realização de análises moleculares para identificar a presença dessa variante (VALAVI; ANSAR ZANDIAN, 2010; DA FONSECA et al., 2015; MOMODU; YUSUF, 2018). A concentração de HbF compreendeu a faixa de 10 a 20%, intervalo este que segundo Tolu e colaboradores (2019) impacta na sobrevida e diminuição de crises vaso-oclusivas em pacientes com AF. De fato, a HbF é um importante modulador da AF, em que sua concentração é elevada com o uso de HU, tendo eficácia no tratamento da doença ao reduzir eventos como a síndrome torácica aguda e a dor aguda (SILVA; SHIMAUTI, 2006; STEINBERG; SEBASTIANI, 2012; SANT'ANA et al., 2017). No entanto, a indução de HbF pelo uso de HU pode ser variável entre os pacientes devido a fatores específicos como a idade e presença de doenças concomitantes, como também a fatores genéticos como, por exemplo, o polimorfismo observado no gene BCL11A que podem alterar a resposta à HU (SALES et al., 2022). Tolu e colaboradores (2019) também observaram que níveis elevados de HbF não previnem completamente o aparecimento de complicações na AF devido a uma distribuição heterocelular de HbF e com o aumento da idade desses pacientes. Com relação aos índices hematimétricos, o VCM se destacou por estar aumentado para os três genótipos, corroborando com resultados obtidos em outros estudos (AKODU; NJOKANMA; ADEOLUKEHINDE, 2015; KHALED et al., 2022). Estes autores observaram que a macrocitose na AF é uma consequência da elevada taxa de hemólise, tendo como resposta a atividade hematopoiética exarcebada.

Quanto a avaliação dos biomarcadores de hemólise em relação aos genótipos do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176, destacou-se o LDH e a contagem de reticulócitos, que comumente estão aumentados na AF, como resultado da hemólise crônica e da atividade exarcebada da medula óssea, respectivamente (GUARDA et al., 2020). A hemólise é um evento primário da inflamação, marcada pela liberação de moléculas que alteram o equilíbrio do NO, causando o dano no endotélio, e sendo assim, os biomarcadores hemolíticos são utilizados para o prognóstico das complicações clínicas na AF (CERQUEIRA et al., 2010; KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017). Entretanto, ao avaliar o perfil hemolítico dos pacientes com AF em relação aos genótipos do polimorfismo acima citado, não foram encontradas associações significativas.

Quanto a análise do perfil da citocina IFN- $\gamma$  modulada pelos IRF, verificou-se um

aumento da mesma em pacientes com AF em relação ao grupo controle. Resultado este que corrobora com vários trabalhos da literatura, que demonstraram esse aumento e uma associação com o perfil inflamatório sistêmico na doença (OJO et al., 2016; KATO et al., 2018; OBEAGY et al., 2022). Destaca-se ainda que a maioria das complicações clínicas na AF estão associadas ao processo inflamatório. Portanto, a doença é genética, porém com um comprometimento importante de dano endotelial, que culmina com o processo inflamatório crônico, sistêmico e não infeccioso, mas com o envolvimento imune, ativação da coagulação e aumento do estresse oxidativo. Elalfy e colaboradores (2018) demonstraram que a inflamação crônica na AF é um ambiente favorável para a ativação imunológica de forma exacerbada. Um estudo demonstrou que o aumento de IFN- $\gamma$  estava relacionado com a elevação da expressão de gp91<sup>phox</sup> em monócitos durante a crise vaso-oclusiva e que este achado induziu a liberação de superóxido e contribuiu com a inflamação (MARÇAL et al., 2007).

Com o propósito de verificar a influência do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 com o perfil sérico de IFN- $\gamma$  nos pacientes com AF, observamos que a presença do genótipo GG está associada com a diminuição de IFN- $\gamma$  com e sem o uso de HU em relação aos pacientes com o genótipo AG. Devido a redução da inflamação proporcionada pela HU, a contribuição do polimorfismo na inflamação foi mais bem avaliada sem o uso do fármaco. Não foi encontrado na literatura associações dos genótipos do polimorfismo rs1877176 com manifestações clínicas na AF ou em outras doenças de modo geral. Dados na literatura mostram que na AF, os níveis séricos de IFN- $\gamma$  estão elevados tanto no estado estacionário como durante a VOC, em virtude do processo inflamatório crônico (OBEAGU et al., 2022). Polimorfismos em genes que codificam proteínas inflamatórias também atuam na suscetibilidade em outras complicações na AF. Joannes e colaboradores (2010) identificaram uma associação do alelo T (selvagem) do polimorfismo +874 (rs2430561) do gene de IFN- $\gamma$  com complicações infecciosas em pacientes com AF (ABUGA et al., 2020). Um estudo avaliando polimorfismos nos genes de várias citocinas em pacientes com AF em estado estacionário, compreendendo dentre elas IL4-T590(C>T) e IL6-174(G>C), identificou que a prevalência do genótipo TT (mutante) da citocina IL-4 está associada com o aumento da expressão desta citocina e com o estado pró-inflamatório da doença, levantando a hipótese do favorecimento da adesão tecidual, a indução de moléculas de adesão e a disfunção endotelial promovidos por IL-4 (GILLI et al., 2016). No entanto, neste mesmo estudo, o genótipo GG (selvagem) do polimorfismo do gene de IL6-174 está associado com o estado inflamatório nos pacientes com AF ao induzir respostas mediadas por Th17 e o desequilíbrio Th17/Treg (GILLI et al., 2016). Um estudo feito com uma mutação em IRF4, p.T95R, mostrou que células T produziram menos IFN- $\gamma$  ao serem estimuladas na

imunodeficiência combinada autossômica dominante humana (IRF4 INTERNATIONAL CONSORTIUM, 2023). Em um estudo experimental com macrófagos M2, foi verificado o efeito modulador da expressão do IRF4 sobre as citocinas anti-inflamatórias (HU et al., 2022). Nesse contexto, podemos inferir que o efeito protetor acima referido do alelo G no AVC está em consonância com os achados da relação entre os baixos níveis de IFN- $\gamma$  com o genótipo GG na AF.

Nesse contexto podemos evidenciar no presente estudo que o alelo G e o genótipo GG do polimorfismo no gene IRF4 na região rs187776 influenciaram tanto nos níveis de IFN- $\gamma$  como na proteção do risco de AVC nos pacientes com AF, demonstrando, portanto, o efeito modulador desse polimorfismo na patogênese da doença, assim como no prognóstico da mesma. No entanto, estudos com uma amostragem maior, ou mais representativa, devem ser realizados para consolidar esses resultados. O presente estudo abre uma frente de pesquisas na referida área nessa população, contribuindo com o melhor entendimento de fisiopatologia, assim como, no avanço da detecção de novos biomarcadores precoces de prognóstico das complicações na AF.

## 6 CONCLUSÃO

A determinação da frequência e genotípica do polimorfismo do gene de IRF4 na região rs1877176 revelou uma prevalência do alelo G e do genótipo GG nos pacientes com AF e nos controles. Não havendo diferença entre a população com e sem a doença.

Houve uma associação do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 com o AVC, onde foi possível observar que pacientes com o genótipo GG tiveram menor risco de desenvolver este evento, sendo assim, conclui-se que a presença do alelo G pode conferir uma proteção em pacientes com AF contra o risco de desenvolver o AVC.

Não houve relação do polimorfismo do gene IRF-4 com nenhum biomarcador laboratorial.

A análise do perfil da citocina IFN- $\gamma$  demonstrou um aumento da mesma em pacientes com AF em relação ao grupo controle, evidenciando a associação com o perfil inflamatório sistêmico da doença.

A associação do polimorfismo do gene IRF4 na região rs1877176 com os níveis de IFN- $\gamma$ , demonstrou que a presença do genótipo GG reduz os níveis séricos desta citocina com e sem o uso de HU, contribuindo com o estado inflamatório estacionário.



## REFERÊNCIAS

- ABAN, I. et al. Severe anemia early in life as a risk factor for sickle-cell kidney disease. **Blood**, v. 129, n. 3, p. 385–387, jan. 2017.
- ABBOUD, M. R. Standard management of sickle cell disease complications. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 13, n. 2, p. 85-90, jun. 2020.
- ABUGA, K. M. Interferon-gamma polymorphisms and risk of iron deficiency and anaemia in Gambian children. **Wellcome Open Research**. v. 5, n. 40, p. 1-18, jun. 2020.
- ADEWOYIN, A. S. management of sickle cell disease: a review for physician education in nigeria (sub-saharan africa). **Anemia**, v. 2015, p. 1-21, 2015.
- AKODU, S. O.; NJOKANMA, O. F.; ADEOLUKEHINDE, O. Erythrocyte indices in pre-school nigerian children with sickle cell anaemia in steady state. **International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research**. v. 9, n. 1, p. 5-9, jan. 2015.
- ALAGBE, A. E. et al. Anti-inflammatory cytokines in sickle cell disease. **Molecular Biology Reports**. v. 49, p 2433 – 2442, jan. 2022.
- BALIGA, B. S. et al. Mechanism for fetal hemoglobin induction by hydroxyurea in sickle cell erythroid progenitor. **American Journal of Hematology**. v. 65, p. 227 – 233, jun. 2000.
- BALLAS, S. K.; LUSARDI M. Hospital readmission for adult acute sickle cell painful episodes: frequency, etiology, and prognostic significance. **American Journal of Hematology**. v. 79, n. 1, p. 17 – 25, mai. 2005.
- BALLAS, S. K. More definitions in sickle cell disease: steady state v base line data. **American Journal of Hematology**, v. 87, n. 3, p. 338–338, dez. 2011.
- BRANDOW, A. M.; LIEM, R. I. Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease. **Journal Of Hematology and Oncology**, v. 15, n. 1, p. 20, 3 mar. 2022.
- BRANDOW, A.M.; ZAPPIA, K.J.; STUCKY, C.L. Sickle cell disease: a natural model of acute and chronic pain. **Pain**. v. 158, (Suppl 1): S79-S84, abr. 2017.
- BRASIL. Portaria nº 55, de 29 de janeiro de 2010. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – Doença falciforme**. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2010/prt0055\\_29\\_01\\_2010.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2010/prt0055_29_01_2010.html). Acesso em: ago. 2023.
- BRODERICK, P. et al. IRF4 polymorphism rs872071 and risk of hodgkin lymphoma. **British Journal of Haematology**, v. 148, n. 3, p. 413-415, fev. 2010.
- BURKE, J. D.; YOUNG, H. A. IFN- $\gamma$ : a cytokine at the right time, is in the right place. **Seminars in Immunology**, v. 43, p. 1 - 19, jun. 2019.
- CANÇADO, R. D. et al. Sickle cell disease mortality in Brazil: real-world evidence. **Blood**. v. 138, n. 1, p. 3025, nov. 2021.

- CAVALCANTE, J. E. A. et al. 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**, v. 9, n. 1, p. 14-19, mar. 2016.
- CERQUEIRA, B. A. V. et al. Associação de marcadores laboratoriais ao perfil clínico em pacientes com anemia falciforme de Salvador- Bahia. **Gazeta Médica da Bahia**. v. 80, n.3, p. 24-28, out. 2010.
- COLOMBATTI, R.; BIRKEGÅRD, C.; MEDICI, M. PB2215: global epidemiology of sickle cell disease: a systematic literature review. **Hemasphere**, v. 6, p. 2085-2086, jun. 2022.
- CONRAN, N.; BELCHER, J.D. Inflammation in sickle cell disease. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**. v. 68, n.2-3, p. 263-299, jan. 2018.
- CRUZ, S. V. et al. Avaliação da qualidade de vida em pacientes adultos com anemia falciforme no norte de Minas Gerais – Brasil. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 26, (Supl 5), p. 23 – 30, 2016.
- DA FONSECA, S. F. et al. Hemoglobin A2 values in sickle cell disease patients quantified by high performance liquid chromatography and the influence of alpha thalassemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 37, n. 5, p. 296-301, out. 2015.
- DE JESUS, A. C. S. et al. Características socioeconômicas e nutricionais de crianças e adolescentes com anemia falciforme: uma revisão sistemática. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 36, n. 4, p. 491-499, dez. 2018.
- DO, T. N. et al. An intronic polymorphism of IRF4 gene influences gene transcription in vitro and shows a risk association with childhood acute lymphoblastic leukemia in males. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1802, n. 2, p. 292-300, fev. 2010.
- DZIKIEWICZ-KRAWCZYK, A. et al. Polymorphisms in microRNA target sites modulate risk of lymphoblastic and myeloid leukemias and affect microRNA binding. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 7, n. 1, p. 1-13, jun. 2014.
- ELALFY, M. S. et al. Immunological role of CD4+CD28<sup>null</sup> T lymphocytes, natural killer cells, and interferon-gamma in pediatric patients with sickle cell disease: relation to disease severity and response to therapy. **Immunologic Research**. v. 66, p. 480–490, jun. 2018.
- FAROOQ, S.; TESTAI, F. D. Neurologic complications of sickle cell disease. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 19, n. 4, p. 1-8, fev. 2019.
- FEATURES, Research. **Confronting the Challenge of Sickle Cell Anaemia**. 2017. Disponível em: <https://researchfeatures.com/confronting-the-challenge-of-sickle-cell-anaemia/>. Acesso em: 28 out. 2023.
- FLANAGAN, J. M. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 117, n. 24, p. 6681 – 6684, abr. 2011.
- FOX. C. K. Hemorrhagic stroke in children and adults with sickle cell anemia: the post-stop cohort. **Stroke**, v. 53, n. 11, p. 63 – 66, out. 2022.

GATHANY, A. H. et al. Relationship between interferon regulatory factor 4 genetic polymorphisms, measures of sun sensitivity and risk for non-Hodgkin lymphoma. **Cancer Causes Control**. v. 20, n. 8, p. 1291-1302, abr. 2009.

GEHLING, G. M. et al. Single nucleotide polymorphisms and sickle cell disease-related pain: a systematic review. **Frontiers in Pain Research**. v. 4. p. 1-8, set. 2023.

GILLI, S. C. O. et al. Cytokine polymorphisms in sickle cell disease and the relationship with cytokine expression. **Experimental Hematology**, v. 44, n. 7, p. 583-589, jul. 2016.

GLADWIN, M. T. Cardiovascular complications in patients with sickle cell disease. **Hematology**, v. 2017, n. 1, p. 423-430, dez. 2017.

GOHAL, G. A. et al. Utilization of hydroxyurea among patients diagnosed with sickle cell disease in Jazan, Saudi Arabia. **Patient Preference and Adherence**, v. 16, p. 3059-3067, nov. 2022.

GUARDA, C. C. et al. Hydroxyurea alters circulating monocyte subsets and dampens its inflammatory potential in sickle cell anemia patients. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 14829, out. 2019.

GUARDA, C. C. et al. Sickle cell disease: a distinction of two most frequent genotypes (HbSS and HbSC). **Plos One**, v. 15, n.1, p. 1-15, jan. 2020.

HOPPE, C. et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 103, n. 6, p. 2391-2396, mar. 2004.

HOPPE, C. et al. Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Stroke**, v. 38, n. 8, p. 2241-2246, ago. 2007.

HU, X. et al. IFN- $\gamma$  suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. **Immunity**, v. 24, n. 5, p. 563-574, mai. 2006.

HU, L. et al. Interferon regulatory factor 4 (IRF4) promotes lipopolysaccharide-induced colonic mucosal epithelial cell proliferation by regulating macrophage polarization. **European Surgical Research**, v. 63, n. 4, p. 257-268, 2022.

IRF4 INTERNATIONAL CONSORTIUM. A multimorphic mutation in IRF4 causes human autosomal dominant combined immunodeficiency. **Science Immunology**. V. 8, p. 1 – 18, jan. 2023.

ITALIA, K.; COLAH, R.; GHOSH, K. Hydroxyurea could be a good clinically relevant iron chelator. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. 1-5, dez. 2013.

JHUN, E. H. et al. Prevalence of pain-related single nucleotide polymorphisms in patients of African origin with sickle cell disease. **Pharmacogenomics**. v. 16, n. 16, p. 1795-1806, nov. 2015.

JIANG, X. N. et al. IRF4 rearrangement may predict favorable prognosis in children and young adults with primary head and neck large B-cell lymphoma. **Cancer Medicine**, v. 12, n. 9, p. 10684-10693, abr. 2023.

JOANNES, M. O. et al. Association of the +874 T/A interferon gamma polymorphism with infections in sickle cell disease. **International Journal of Immunogenetics**, v. 37, n. 4, p. 219-223, abr. 2010.

JORGOVANOVIC, D. et al. Roles of IFN- $\gamma$  in tumor progression and regression: a review. **Biomarker Research**. v. 8, n. 49, p. 1 – 16, set. 2020.

KARKI, R. et al. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. **BioMed Central Medical Genomics**. v.8, n.37, p. 1-7, jul. 2015.

KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 127, n. 3, p. 750-760, mar. 2017.

KATO, J. G. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 4, n. 18010, p. 1 – 22, mar. 2018.

KHALED, S. A. A. et al. Hematological, biochemical properties, and clinical correlates of hemoglobin s variant disorder: a new insight into sickle cell trait. **Journal of Hematology**, v. 11, n. 3, p. 92-108, jun. 2022.

KIRKHAM, F. J.; LAGUNJU, I. A. Epidemiology of stroke in sickle cell disease. **Journal of Clinical Medicine**. v. 10, n. 18, p. 1 - 22 set. 2021.

KONSTANTINOOU, E. et al. Interactions of hydroxycarbamide (hydroxyurea) with iron and copper: implications on toxicity and therapeutic strategies. **Hemoglobin**, v. 35, n. 3, p. 237-246, mai. 2011.

LAKKAKULA, B.V. K. S.; PATTNAIK, S. The HBG2 rs7482144 (C > T) polymorphism is linked to HbF levels but not to the severity of sickle cell anemia. **Journal of Pediatric Genetics**. v. 12, n. 2, p. 129 - 134, ago. 2021.

LAURENCE, B.; HAYWOOD JUNIOR, C.; LANZKRON, S. Infecções dentárias aumentam a probabilidade de internações hospitalares entre pacientes adultos com doença falciforme. **Saúde Bucal Comunitária**. v. 30, n. 3, p. 168 – 172, 2013.

LOGGETTO, S. R. et al. Guidelines on sickle cell disease: primary stroke prevention in children and adolescents. associação brasileira de hematologia, hemoterapia e terapia celular guidelines project. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 44, n. 1, p. 85-94, jan. 2022.

LUPIAÑEZ, C. B. et al. Common genetic polymorphisms within NF $\kappa$ B-related genes and the risk of developing invasive aspergillosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1243, p. 1- 11, ago. 2016.

MARÇAL, L. E. et al. Up-regulation of NADPH oxidase components and increased

production of interferon-gamma by leukocytes from sickle cell disease patients. **American Journal of Hematology**, v. 83, n. 1, p. 41-45, 2007.

MCGANN, P. T; WARE, R. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 14, n. 11, p. 1749-1758, 14 set. 2015.

MERLI, P. et al. The role of interferon-gamma and its signaling pathway in pediatric hematological disorders. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 68, n. 4, p. 1 - 11, jan. 2021.

MOMODU, I.; YUSUF, A. A. The percentage levels of HbS, HbF and HbA2 in patients with sickle cell diseases using HPLC: a diagnostic guide to the physicians. **International Journal of Advances in Medical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 8-14, fev, 2018.

MONACO JUNIOR, C. P.; FONSECA, P. B. B.; BRAGA, J. A. P. Complicações infecciosas em crianças com doença falciforme após esplenectomia cirúrgica. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 33, n. 2, p. 150-153, jun. 2015.

MOSAYYEBI, S. et al. The genetic variants of interferon regulatory factor-3 in children with asthma. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 40, n. 12, p. 570-577, dez. 2020.

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, p. 1- 8, 2022.

NCBI. **Genoma Data Viewer**. Disponível em:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/?assm=GCF\\_000001405.40](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/?assm=GCF_000001405.40). Acesso em: 03 ago. 2023.

NEGISHI, H.; TANIGUCHI, T.; YANAI, H. The interferon (IFN) class of cytokines and the IFN regulatory factor (IRF) transcription factor family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 11, p. a028423, 29 set. 2017.

NOVELLI, E. M.; GLADWIN, M. T. Crises in sickle cell disease. **Chest**, v. 149, n. 4, p. 1082-1093, abr. 2016.

OBEAGU, E. I. An update on interferon gamma and C reactive proteins in sickle cell anaemia crisis. **Journal of Biomedical Sciences**. v. 1, n. 10, p. 1 – 6, out. 2022.

OJO, O. T. et al. Serum levels of gamma-interferon and interleukin-4 in homozygous sickle cell anaemia patients. **International Blood Research and Reviews**, v. 5, n. 2, p. 1-7, 2016.

PEDROSA, A. M.; LEAL, L. K. A.M.; LEMES, R. P. G. Effects of hydroxyurea on cytotoxicity, inflammation and oxidative stress markers in neutrophils of patients with sickle cell anemia: dose-effect relationship. **Hematologist, Transfusion and Cell Therapy**. v. 43, n. 4, p. 468 – 475, out. 2021.

PLATT, O. S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. **New England journal of Medicine**. v. 358, p. 1362 – 1369, 2008.

RAMADAS, N.; SPARKENBAUGH, E. M. The APC-EPCR-PAR1 axis in sickle cell disease. **Frontiers in Medicine**, v. 10, p. 1 – 8, 2023.

RAMOS, J. T. et al. Mortalidade por doença falciforme em estado do nordeste brasileiro. **Revista de Enfermagem do Centro-Oeste Mineiro**, v. 5, n. 2, p.1604-1612, 2015.

SALES, R. R. et al. 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**. v. 12 (779497), p. 1-13, jan. 2022.

SANT'ANA, P. G. S. et al. Clinical and laboratory profile of patients with sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 39, n. 1, p. 40-45, mar. 2017.

SANTOS, J. L. et al. Mutagenic and genotoxic effect of hydroxyurea. **International Journal of Biomedical Science**. v. 7, n. 4, p. 263 – 267, dez. 2011.

SARAT, C. N. F. et. al. Prevalência da doença falciforme em adultos com diagnóstico tardio. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 32, n. 2, p. 202-209, mar. 2019.

SAUNTHARARAJAH, Y. Targeting sickle cell disease root-cause pathophysiology with small molecules. **Haematologica**. v. 104, n. 9, p. 1720-1730, 8 ago. 2019.

SEGAL, J. B. et al. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell disease. **Evidence Report Technology Assessment (Full Rep)**. v. 165, p. 1 - 3, mar. 2008.

SILVA-PINTO, A. C. et al. Economic burden of sickle cell disease in Brazil. **Plos One**, v. 17, n. 6, p. e0269703, 16 jun. 2022.

SILVA, R. B. P.; RAMALHO, A. S.; CASSORLA, R. M. S. A anemia falciforme como problema de Saúde Pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 1, p. 54-58, fev. 1993.

SILVA, M. C.; SHIMAUTI, E. L. T. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 2, p. 144-148, jun. 2006.

SINGH, R.S.; KULATHINAL, R.J. Polymorphism. **Brenner'S Encyclopedia of Genetics (Second Edition)**, p. 398-399, 2013.

SKEETE, J.; DIPETTE, D. J. Genetics of hypertension: Implications of single nucleotide polymorphism(s) in African populations and beyond. **Journal of Clinical Hypertension**. v. 20, n. 3, p. 496 – 498, ma. 2018.

SOUSA, J. C. **Fatores reguladores de interferon (IRFs) em pacientes com síndrome mielodisplásica**. 2015. 200 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, 2015.

STEINBERG, M. H. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 4, p. 204-210, abr. 2006.

STEINBERG, M. H.; SEBASTIANI, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 87, n. 8, p. 795-803, mai. 2012.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of sickle cell disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. 1, p. 263-292, jan. 2019.

TALAHMA, M.; STRBIAN, D.; SUNDARARAJAN, S. Sickle cell disease and stroke. **Stroke**. V. 45, n. 6, p. e98 – e100, jun. 2014.

TANABE, P. et al. CE: understanding the complications of sickle cell disease. **The American Journal of Nursing**., v. 119, n. 6, p. 26-35, jun. 2019.

TARANTINI, F. et al. IRF4 gene expression on the trail of molecular response: looking at chronic myeloid leukemia from another perspective. **Acta Haematologica**, v. 146, n. 1, p. 37-43, 4 out. 2022.

TAYLOR VI, J. G. et al. Variants in the VCAM1 gene and risk for symptomatic stroke in sickle cell disease. **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4303-4309, dez. 2002.

TCHOPBA, C. N. et al. Systemic t cell subsets and cytokines in patients with homozygous sickle cell disease and asymptomatic urinary tract infections in togo. **Ochsner Journal**, v. 21, n. 2, p. 163-172, 2021.

THOMSON, A. M. et al. Global, regional, and national prevalence and mortality burden of sickle cell disease, 2000–2021: a systematic analysis from the global burden of disease study 2021. **The Lancet Haematology**, v. 10, n. 8, p. 1-15, ago. 2023.

TOLU, S. S. et al. High hemoglobin f in sickle cell disease: waning protection with age. **Blood**, v. 134, n. 1, p. 1-3, nov. 2019.

TOZATTO-MAIO, K. et al. Polymorphisms in inflammatory genes modulate clinical complications in patients with sickle cell disease. **Frontiers in Immunology**. v.11 (2041), p. 1-12, set. 2020.

VALAVI, E.; ANSARI, M. J. A. ZANDIAN, K. How to reach rapid diagnosis in sickle cell disease? **Iranian Journal of Pediatrics**, v. 20, n. 1, p. 69-74, mar, 2010.

VALLEJOS-VIDAL, E. et al. Single-nucleotide polymorphisms (SNP) mining and their effect on the tridimensional protein structure prediction in a set of immunity-related expressed sequence tags (EST) in atlantic salmon (*Salmo salar*). **Frontiers in Genetics**. v. 10 (1406), p. 1-18, fev. 2020.

VERDUZCO, L. A.; NATHAN, D. G. Sickle cell disease and stroke. **Blood**, v. 114, n. 25, p. 5117 – 5125, dez. 2009.

WANG, S. et al. Association of interferon regulatory factor 4 gene polymorphisms rs12203592 and rs872071 with skin cancer and haematological malignancies susceptibility: a meta-analysis of 19 case-control studies. **BioMed Central Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1-11, jun. 2014.

WANG, J. et al., Genome-wide association analyses identify variants in IRF4 associated with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome susceptibility. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 1-11, jun. 2021.

WARD, S. V. Association of IRF4 SNP rs12203592 with melanoma-specific survival. **British Journal of Dermatology**, v. 183, n. 1, p. 163 – 165, jul. 2020.

WILLIAMS, T. N.; THEIN, S. L. Sickle cell anemia and its phenotypes. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 19, n. 1, p. 113-147, ago. 2018.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 207-214, set. 2007.



## APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo intitulado “Polimorfismos em genes de fatores reguladores de interferon em pacientes com anemia falciforme: associação com biomarcadores de inflamação e reguladores do ferro.”, o qual está sendo desenvolvido pela Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes. Antes de decidir se deseja participar (de livre e espontânea vontade) você deve ler e compreender todo o conteúdo e, em caso de dúvidas, a equipe deste estudo responderá às suas perguntas. Ao final, caso decida participar, você será solicitado (a) a assinar este documento e receberá uma cópia.

O objetivo deste estudo é avaliar como as características presentes no sangue influenciam a inflamação em pessoas com Anemia Falciforme, de forma que poderá beneficiar os portadores de anemia falciforme possibilitando maiores informações sobre a doença ao profissional de saúde o que auxilia na tomada de decisões e intervenções terapêuticas para melhor qualidade de vida do paciente. Para tanto, solicitamos que o(a) Sr. (a) autorize a coleta de 2 (dois) tubos de sangue (4 mL), as quais serão obtidas por punção venosa no braço. Também serão coletadas informações sobre seu exame de sangue (hemograma), frequência de crises dolorosas e uso do medicamento Hidroxiureia, além da idade, sexo, peso e altura presentes em seu prontuário. Os riscos envolvidos na participação do estudo são maiores que o mínimo, estando relacionados com a possibilidade de dor e formação de mancha roxa devido à coleta de sangue. A fim de evitar isso, as coletas serão realizadas por equipe treinada. O sangue coletado será transportado em gelo no isopor até o Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica, do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará e, após analisadas, serão armazenadas em freezer a -80oC para posterior análise de material genético.

A participação do(a) senhor(a) na pesquisa será oportunística, plenamente voluntária e consciente. Não haverá qualquer forma de pagamento, compensação material ou prejuízo de sua assistência médica. O(a) senhor(a) pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Suas amostras serão descartadas através de incineração de material biológico por uma empresa especializada contratada pela Universidade Federal do Ceará ao fim do estudo (dezembro de 2023). 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. 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 investigador é Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, endereço para contato: Rua Pastor Samuel Munguba, 1210 – Rodolfo Teófilo, CEP 60430-372 - Fortaleza, CE – Brasil, Telefone: (85) 99822-4040.

Se o(a) Senhor(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HEMOCE – E-mail: cep@hemoce.gov.ce.br. Caso o(a) Senhor

(a) sinta-se 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) concorda em participar solicitamos que assine no espaço abaixo nas duas vias do documento. Você ficará com uma das vias assinadas por você ou seu responsável legal e pelo pesquisador.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente/ representante legal

Data: / /

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo

Data: / /

## APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLE

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo intitulado “Polimorfismos em genes de fatores reguladores de interferon em pacientes com anemia falciforme: associação com biomarcadores de inflamação e reguladores do ferro.”, o qual está sendo desenvolvido pela Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes. Antes de decidir se deseja participar (de livre e espontânea vontade) você deve ler e compreender todo o conteúdo e, em caso de dúvidas, a equipe deste estudo responderá às suas perguntas. Ao final, caso decida participar, você será solicitado (a) a assinar este documento e receberá uma cópia.

O objetivo deste estudo é avaliar como as características presentes no sangue influenciam a inflamação em pessoas com Anemia Falciforme, de forma que poderá beneficiar os portadores de anemia falciforme possibilitando maiores informações sobre a doença ao profissional de saúde o que auxilia na tomada de decisões e intervenções terapêuticas para melhor qualidade de vida do paciente. Para tanto, solicitamos que o(a) Sr. (a) autorize a coleta de 2 (dois) tubos de sangue (4 mL), as quais serão obtidas por punção venosa no braço no momento da doação. Também serão coletadas informações sobre dados laboratoriais (hemograma), idade, sexo, peso e altura presentes em seu prontuário. Os riscos envolvidos na participação do estudo são maiores que o mínimo, estando relacionados com a possibilidade de dor e formação de mancha roxa devido à coleta de sangue. A fim de evitar isso, as coletas serão realizadas por equipe treinada. As amostras coletadas serão transportadas em gelo no isopor até o Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica, do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará e, após analisadas, serão armazenadas em freezer a -80oC para posterior análise de material genético.

A participação do(a) senhor(a) na pesquisa será oportunística, plenamente voluntária e consciente. Não haverá qualquer forma de pagamento ou compensação material. O(a) senhor(a) pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Suas amostras serão utilizadas para comparação dos resultados com pacientes portadores de anemia falciforme e, ao fim do estudo, serão descartadas através de incineração de material biológico por uma empresa especializada contratada pela Universidade Federal do Ceará. 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. 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 investigador é Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, endereço para contato: Rua Pastor Samuel Munguba, 1210 – Rodolfo Teófilo, CEP 60430-372 - Fortaleza, CE – Brasil, Telefone: (85) 99822-4040.

Se o(a) Senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HEMOCE – E-mail: cep@hemoce.ce.gov.br. Caso o Senhor (a) sinta-se 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) concorda em participar solicitamos que assine no espaço abaixo nas duas vias do documento. Você ficará com uma das vias assinadas por você ou seu responsável legal e pelo pesquisador.

\_\_\_\_\_  
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 º Rodolfo Teófilo º Comedor Administrativo - Sala Prof. Murilo Martins Cidade: F  
**Bairro:** RODOLFO TEOFILO **CEP:** 60.431-086  
**UF:** CE **Município:** FORTALEZA  
**Telefone:** (85)3101-2273 **E-mail:** cep@hemoce.ce.gov.br

## CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ - HEMOCE



Continuação do Parecer: 6.185-474

com a idade e sexo. Os dados clínicos (frequência de crises dolorosas, uso de hidroxiureia), epidemiológicos (idade, sexo, peso e altura) e laboratoriais (hemograma e dosagem de hemoglobina fetal) serão consultados nos prontuários. Será coletada uma amostra de sangue em tubo com gel separador para as dosagens das citocinas INF- e IL-6. Ainda, uma amostra de sangue/EDTA para extração de DNA. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) de IRF-1 (rs 839), IRF-4 (rs 12203592 e rs 1877176) e IRF-8 (rs 10515611) serão analisados por ensaio de discriminação alélica por PCR em tempo real no 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, California, USA).

### **Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo geral:** Avaliar a ocorrência dos polimorfismos nos genes de IRF-1, IRF-4 e IRF-8 e os marcadores do ciclo do ferro em pacientes com anemia falciforme. **Objetivos secundários:** Analisar a ocorrência de polimorfismos nos genes de IRF-1, IRF-4 e IRF-8 em pacientes com anemia falciforme e indivíduos saudáveis; Realizar a quantificação sérica de citocinas inflamatórias em pacientes com anemia falciforme e indivíduos saudáveis; Identificar a relação entre a ocorrência de polimorfismos e a expressão de citocinas inflamatórias em pacientes com anemia falciforme; Associar a ocorrência de polimorfismos com as crises vaso-oclusivas em pacientes com anemia falciforme; Associar as dosagens séricas de hepcidina, eritroferrona e citocinas inflamatórias ao grau de anemia e ao uso de HU de pacientes com AF; Investigar a associação das dosagens séricas de hepcidina e eritroferrona com o perfil do ferro (ferro sérico, ferritina sérica, capacidade total de ligação do ferro, índice de saturação do ferro, receptor solúvel do ferro), nos pacientes com AF; Avaliar o comportamento da hepcidina e da eritroferrona em pacientes com AF que apresentam sobrecarga de ferro.

### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos são mínimos e relacionados à coleta de sangue que os pacientes já estão acostumados. Além do risco de divulgação de dados pessoais. Os benefícios são grandes pelo melhor entendimento das causas dos efeitos inflamatórios da doença.

### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A emenda apresentada diz respeito à inclusão de análise de três polimorfismos em dois membros da família dos fatores reguladores de interferon, a saber: IRF-4 (rs 12203592 e rs 1877176) e IRF-8 (rs 10515611). A escolha desses polimorfismos é justificada por sua relação com a resposta imune e o perfil das respostas inflamatórias, incluindo a imunopatogenicidade da doença falciforme. Ademais, não haverá mudanças metodológicas.

**Endereço:** Av. José Bastos, 3390 º Rodolfo Teófilo º Comedor Administrativo - Sala Prof. Murilo Martins Cidade: F  
**Bairro:** RODOLFO TEOFILO **CEP:** 60.431-066  
**UF:** CE **Município:** FORTALEZA  
**Telefone:** (85)3101-2273 **E-mail:** csp@hemoce.ce.gov.br

**CENTRO DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO CEARÁ -  
HEMOCE**



Continuação do Parecer: 6.185.474

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram devidamente apresentados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O Comitê de Ética em pesquisa do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará analisou o projeto e o considerou aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O pesquisador(a) deverá apresentar relatório parcial a cada seis meses, e o relatório final quando do término do estudo (Resolução 466/2012, XI.2.d e Resolução 510/16, Art. 28, V), via notificação na Plataforma Brasil.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2168582_É1.pdf	24/06/2023 11:38:42		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Emenda_Projeto_mestrado_Luan_final.docx	24/06/2023 11:38:18	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Controlé.docx	12/09/2022 11:09:01	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_AF.docx	12/09/2022 11:08:50	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Romelia_Lemes.pdf	12/09/2022 11:08:10	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Outros	lattes_luan.pdf	12/09/2022 11:06:35	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Outros	TFD_Luan_Reboucas.pdf	12/09/2022 11:01:40	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TDA_Luan_Reboucas.pdf	12/09/2022 11:01:11	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AEP_Luan_Reboucas.pdf	12/09/2022 10:59:38	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES	Aceito

**Situação do Parecer:**

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

CENTRO DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO CEARÁ -  
HEMOCE



Continuação do Parecer: 6.185.474

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FORTALEZA, 17 de Julho de 2023

---

**Assinado por:**  
**Luiz Ivando Pires Ferreira Filho**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. José Bastos, 3390 ç Rodolfo Teófilo ç Comedor Administrativo - Sala Prof. Múilo Martins Cidade: F  
**Bairro:** RODOLFO TEÓFILO **CEP:** 60.431-088  
**UF:** CE **Município:** FORTALEZA  
**Telefone:** (85)3101-2273 **E-mail:** cep@hemoce.ce.gov.br