



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

LUAN REBOUÇAS CASTELO

**POLIMORFISMO DO FATOR DE REGULADOR DE INTERFERON 1 (rs839) EM
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME: ASSOCIAÇÃO COM
BIOMARCADORES CLÍNICOS E DE INFLAMAÇÃO**

FORTALEZA

2024

LUAN REBOUÇAS CASTELO

**POLIMORFISMO DO FATOR DE REGULADOR DE INTERFERON 1 (rs839) EM
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME: ASSOCIAÇÃO COM
BIOMARCADORES CLÍNICOS E DE INFLAMAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Medicina II.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio.

FORTALEZA

2024

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)

- C345p Castelo, Luan.
Polimorfismo do fator regulador de interferon 1 (rs839) em pacientes com anemia falciforme :
Associação com biomarcadores clínicos e de inflamação / Luan Castelo. – 2024.
62 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Patologia, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.
Coorientação: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio.
1. Hemoglobinopatias. 2. Polimorfismos de nucleotídeo único. 3. Inflamação. I. Título.
CDD 571.9
-

LUAN REBOUÇAS CASTELO

**POLIMORFISMO DO FATOR DE REGULADOR DE INTERFERON 1 (rs839) EM
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME: ASSOCIAÇÃO COM
BIOMARCADORES CLÍNICOS E DE INFLAMAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Medicina II.

Aprovada em: 08/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Deysi Viviana Tanazoa Wong
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Maria do Socorro Queiroz Alves de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Renata Mirian Nunes Eleutério
Unichristus

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

A Prof^ª. Dr^ª. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes e ao Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio pela excelente orientação, apoio e ensinamentos durante toda a execução do trabalho.

As membras da banca avaliadora, que contribuíram imensamente na minha formação como pesquisador e para a versão final desse trabalho.

Ao HEMOCE pela oportunidade de ter trabalhado com os pacientes com anemia falciforme atendidos na instituição, bem como aos profissionais que auxiliaram no processo.

Ao Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFC pela parceria.

Aos novos colegas e amigos que fiz no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas. A companhia de vocês foi essencial para tornar essa experiência tão rica e leve. O tribunal me proporcionou evolução dentro e fora das academias, gratidão.

Aos colegas de outros laboratórios que me auxiliaram na elaboração e execução dos experimentos. Ter essa troca de experiência me enriqueceu como pesquisador.

Aos velhos amigos do colégio e da graduação. Os encontros pontuais me encheram de alegria e nostalgia, reiterando o quão bom é ter pessoas que agregam positivamente em minha vida. No fim, quase nada mudou.

Aos meus pais e família, o que vocês fizeram para que eu pudesse chegar até aqui é, no mínimo, admirável. Serei eternamente grato por todo o esforço, amor e carinho em mim investido.

A Marcos, pela ótima companhia, apoio, amor e parceria que vem bem antes do mestrado. Aos nossos gatinhos, Pix e Barão (*Black*) Phillip de Pôncio, duas verdadeiras surpresas que enfeitaram ainda mais nossa rotina. Papai ama, papai cuida.

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma doença autossômica recessiva causada por uma mutação de ponto no gene da β -globina denominado de hemoglobina S (HbS) em homozigose. Em condições de hipóxia a HbS se polimeriza, causando alteração conformacional na hemácia, denominada de drepanócito. A doença é caracterizada pela anemia hemolítica crônica e por crises de vaso-oclusões recorrentes, responsáveis por desencadear processos inflamatórios sistêmicos. Vários moduladores foram relacionados ao processo inflamatório da AF. Dentre eles os polimorfismos genéticos podem estar relacionados com os diferentes fenótipos da doença, tornando essencial a identificação dessas variações para a determinação de prognóstico. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) de *IRF1* foram associados com neoplasias e doenças inflamatórias como Doença de Chron, evidenciando a necessidade de investigações acerca de seus impactos na AF. O objetivo do estudo foi avaliar a frequência do polimorfismo do fator regulador de interferon 1 (rs839) em pacientes com anemia falciforme e sua associação com biomarcadores clínicos e de inflamação. Participaram do estudo 68 pacientes adultos com diagnóstico de AF e 82 doadores de sangue como grupo controle (GC). Os dados epidemiológicos (idade e sexo), antropométricos (peso e altura e índice de massa corpórea - IMC), clínicos (crises de vaso oclusão graves, síndrome torácica aguda, acidente vascular cerebral, úlceras de membros inferiores, necrose avascular, priapismo, colelitíase e colecistite), laboratoriais (hemograma, contagem de reticulócitos e perfil eletroforético de hemoglobina) e farmacológicos (uso de hidroxiureia, dose e tempo) foram obtidos em prontuários. O polimorfismo de *IRF1* (rs839) foi determinado por PCR em tempo real utilizando-se sondas *TaqMan*. Adotou-se como significância um valor de $p < 0,05$. A maioria dos pacientes, 43 (63,2%), foi do sexo feminino, e 38 (55,9%) tinham IMC dentro da faixa normal. Com relação à clínica, 50 (73,5%) apresentaram crises de vaso-oclusão não graves no último ano, 57 (83,8%) grau de anemia moderado e 48 (70,6%) usavam HU, com dose de 21,8 mg/kg/dia e 42 (61,8%) por mais de 5 anos. Houve diferença estatística entre os biomarcadores hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), leucócitos, linfócitos, monócitos, plaquetas e razão neutrófilos/linfócitos em relação ao grupo controle. Pacientes apresentaram níveis mais elevados de proteína C reativa em comparação com o grupo controle. A determinação da frequência alélica e distribuição genotípica do polimorfismo de *IRF1* (rs839) demonstrou prevalência do alelo selvagem C (65,4%; 62,8%) e genótipo CT (48,5%; 52,4%) nos pacientes com AF e GC, não havendo diferença estatística entre grupos. Pacientes com genótipos CT e TT que não faziam uso de hidroxiureia apresentaram contagem de

monócitos e plaquetas elevadas em relação ao genótipo CC. Pacientes com genótipo TT apresentaram maior incidência de colecistite em relação aos genótipos CC e CT. Em suma, o estudo demonstrou haver associação entre o genótipo TT do polimorfismo de *IRF1* (rs839) com contagem elevada de monócitos e plaquetas e histórico de colecistite em pacientes com AF, evidenciando a sua associação com mau prognóstico. No entanto, estudos com amostragem maior são necessários para comprovar tais achados.

Palavras-chave: hemoglobinopatias; polimorfismos de nucleotídeo único; inflamação.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is an autosomal recessive disease caused by a point mutation in the β -globin gene, resulting in hemoglobin S (HbS) in homozygosity. Under hypoxic conditions, HbS polymerizes, causing a conformational change in the red blood cells, termed sickle cells. The disease is characterized by chronic hemolytic anemia and recurrent vaso-occlusive crises, which trigger systemic inflammatory processes. Various modulators are associated with the inflammatory process in SCA, among which genetic polymorphisms may correspond to different phenotypes of the disease, making the identification of these variations essential for prognosis determination. Single nucleotide polymorphisms (SNP) of the interferon regulatory factor 1 (*IRF1*) have been associated to neoplasms and inflammatory diseases such as Chron's disease, underscoring the need to investigate their impacts on SCA. This study aimed to evaluate the frequency of interferon regulatory factor 1 polymorphism (rs839) in patients with sickle cell anemia patients and its association with clinical and inflammatory biomarkers. Sixty-eight adult patients with SCA and 82 blood donors as a control group (CG) participated in the study. Epidemiological data (age and sex), anthropometric data (weight, height, and body mass index - BMI), clinical data (severe vaso-occlusion crisis, acute chest syndrome, stroke, avascular necrosis, leg ulcers, priapism, cholelithiasis, and cholecystitis), laboratory data, (blood count, reticulocyte count, and hemoglobin electrophoretic profile), and pharmacological data (use of hydroxyurea, dose, and duration) were obtained from medical records. The *IRF1* polymorphism rs839 was determined by real-time PCR using TaqMan probes. A significance level of $p < 0.05$ was adopted. The majority of patients, 43 (63.2%), were female, and 38 (55.9%) had a BMI within the normal range. Regarding clinical presentation, 50 (73.5%) experienced non-severe vaso-occlusion crises in the last year, 57 (83.8%) had moderate anemia, and 48 (70.6%) were using hydroxyurea, with a dose of 21.8mg/kg/day, and 42 (61.8%) had been on medication for more than 5 years. There were statistical differences between hemoglobin (Hb), mean corpuscular volume (MCV), leukocytes, lymphocytes, monocytes, platelets, and neutrophil/lymphocyte ratio in relation to the control group. Patients had higher levels of C-reactive protein compared to the control group. Determination of the allele frequency and genotypic distribution of the *IRF1* polymorphism (rs839) showed a prevalence of the wild-type allele C (65.4%; 62.8%) and CT genotype (48.5%; 52.4%) in patients with SCA and CG, with no statistical difference between groups. Patients with CT and TT genotypes who were not taking hydroxyurea had elevated monocyte and platelet counts compared to the CC genotype. Patients with TT genotype had a

higher incidence of cholecystitis compared to CC and CT genotypes. In summary, the study demonstrated an association between the TT genotype of the *IRF1* polymorphism (rs839) with elevated monocyte and platelet counts, and a history of cholecystitis in patients with SCA, highlighting its association with poor prognosis. However, studies with larger sample sizes are necessary to confirm these findings.

Keywords: Hemoglobinopathies; Single nucleotide polymorphism; Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mutação no gene da β -globina.....	15
Figura 2 – Prevalência da anemia falciforme no mundo.....	16
Figura 3 – Complicações clínicas da anemia falciforme.....	19
Figura 4 – Organização estrutural dos genes de fatores reguladores de interferon (IRF)..	25
Figura 5 – Curvas de amplificação do polimorfismo de nucleotídeo único do gene <i>IRF1</i> rs839.....	31
Figura 6 – Gráfico ternário de equilíbrio de Hardy-Weinberg de pacientes com anemia falciforme e grupo controle.....	34
Figura 7 – Níveis de hemoglobina fetal em pacientes com anemia falciforme.....	35
Figura 8 – Biomarcadores de inflamação em pacientes com anemia falciforme independente do uso de hidroxureia nos diferentes genótipos do polimorfismo de <i>IRF1</i> (rs839).....	36
Figura 9 – Influência do uso de hidroxureia sobre biomarcadores de inflamação em pacientes com anemia falciforme.....	37
Figura 10 – Biomarcadores de inflamação em pacientes com anemia falciforme que não fazem uso de hidroxureia nos diferentes genótipos do polimorfismo de <i>IRF1</i> (rs839)	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados sociodemográficos e laboratoriais de pacientes com anemia falciforme e grupo controle.....	33
Tabela 2 – Uso de hidroxiureia e histórico de complicações clínicas de pacientes com anemia falciforme.....	34
Tabela 3 – Frequência alélica e distribuição genotípicas do polimorfismo de <i>IRF1</i> rs839 em pacientes com anemia falciforme.....	35
Tabela 4 – Associação entre frequência alélica e distribuição genotípica do polimorfismo rs839 e uso de hidroxiureia em pacientes com anemia falciforme.....	35
Tabela 5 – Associação entre frequência alélica e distribuição genotípica de rs839 com níveis de proteína C reativa em pacientes com anemia falciforme.....	36
Tabela 6 – Associação entre frequência alélica e distribuição genotípica de rs839 com as complicações clínicas em pacientes com anemia falciforme.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF anemia falciforme
AVC acidente vascular cerebral
BCAM-1/Lu molécula de adesão celular basal-1/*Lutheran*
BEB *Back Extraction Buffer*
DAMP padrões moleculares associados a dano
DBD domínio de ligação ao DNA
DF doença falciforme
eDAMP padrões moleculares associados a danos em eritrócitos
ERO espécies reativas de oxigênio
GC grupo controle
G-CSF fator estimulador de colônias de granulócitos
HbA hemoglobina A
HbC Hemoglobina C
HbF hemoglobina fetal
HbS hemoglobina S
HEMOCE Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
HPLC cromatografia líquida de alta eficiência
ICAM-1 molécula de adesão intercelular-1
ICAM-4 molécula de adesão intercelular-4
ICS sequência de consenso de interferon
IMC Índice de Massa Corpórea
IRF fator regulador de interferon
IRF1 fator regulador de interferon 1
ISRE elemento de resposta estimulado por interferon
NET armadilhas extracelulares de neutrófilos
NO óxido nítrico
PRD domínio regulatório positivo
PBS tampão fosfato-salina
PS fosfatidiserina
SNP polimorfismo de nucleotídeo único
STA síndrome torácica aguda
TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β fator de transcrição de crescimento beta

TLR4/MD-2 complexo de receptor Tipo Toll-4 e diferenciador mieloide-2

VCAM-1 molécula de adesão vascular-1

VCM volume corpuscular médio

SUMÁRIO

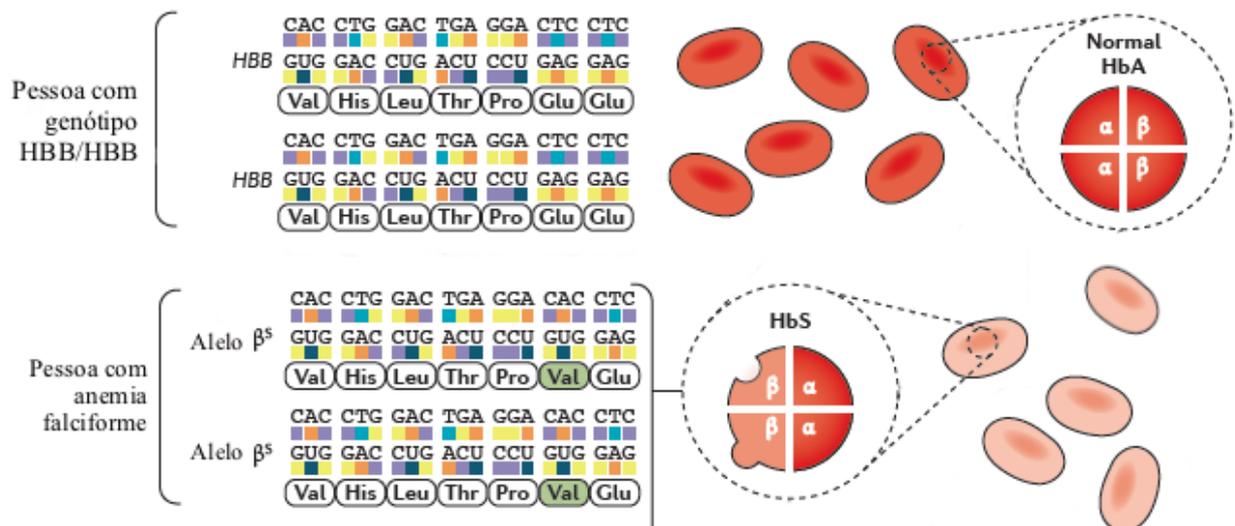
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Anemia Falciforme	15
1.2 Fisiopatologia da Anemia falciforme	16
1.3 Inflamação na Anemia falciforme	18
1.4 Complicações clínicas da Anemia Falciforme	19
1.5 Tratamento.....	23
1.6 Moduladores genéticos da anemia falciforme e polimorfismos	24
1.7 Família dos Fatores Reguladores de Interferon (IRF).....	25
1.8 Fator Regulador de Interferon-1	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Aspectos Éticos.....	29
3.2. Casuística.....	29
3.3. Seleção de amostras.....	29
3.4. Coleta de dados e amostras.....	30
3.5. Extração de DNA de sangue periférico	30
3.6. Análise de polimorfismo rs839	311
3.7. Análises estatísticas	32
4 RESULTADOS.....	33
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES.....	57
APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO CONTROLE.....	58
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anemia Falciforme

A anemia falciforme (AF) é uma doença autossômica recessiva, considerada uma das hemoglobinopatias mais frequentes no mundo. É causada por uma mutação de ponto ($GAG > GTG$) no códon do gene da β -globina cuja consequência é a substituição de um resíduo de ácido glutâmico, um aminoácido hidrofílico, por valina, um aminoácido hidrofóbico, na posição seis da cadeia polipeptídica. Assim, há formação de uma hemoglobina mutante, denominada hemoglobina S (HbS) em substituição à hemoglobina A (HbA) (Figura 1) (Costa; Conran; Feltrin, 2013; Piel *et. al.*, 2013).

Figura 1 - Mutação no gene da β -globina.



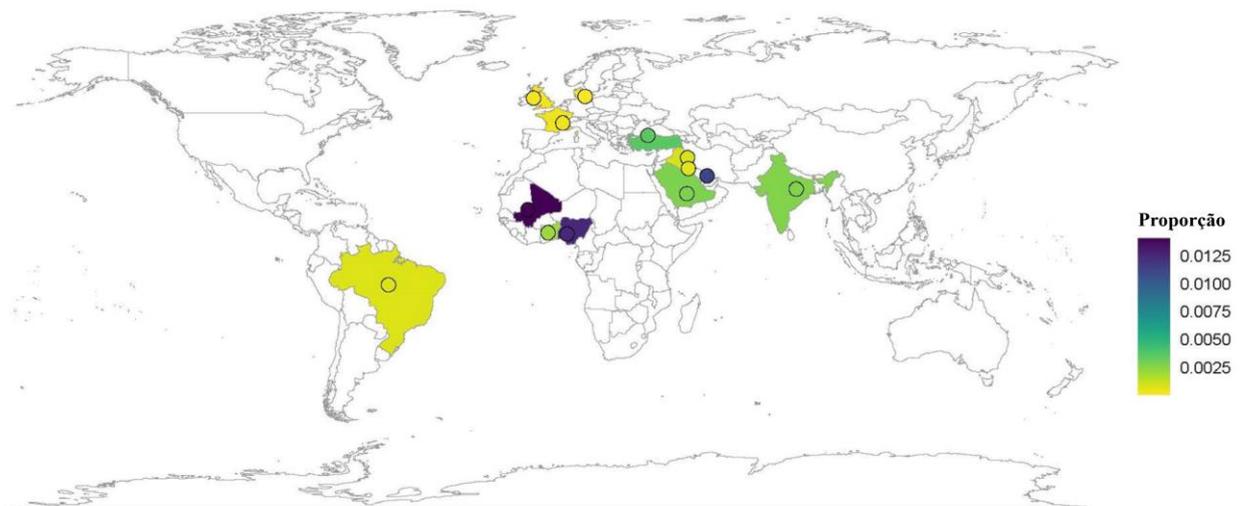
Fonte: Adaptado de Kato *et. al.* (2018). A hemoglobina normal (HbA) é formada por duas cadeias α e duas cadeias β . A hemoglobina mutante HbS é resultante de uma mutação pontual que substitui ácido glutâmico por valina. Indivíduos com anemia falciforme herdam dois alelos mutantes β^S .

NA AF, o gene da HbS está presente em homozigose (HbSS), o que a distingue das outras formas da doença falciforme (DF) e do traço falciforme (HbAS) e a qualifica como a forma mais grave entre todas as manifestações da condição. Devido à sua gravidade, o tratamento exige um diagnóstico precoce e manejo cuidadoso da doença com a finalidade de evitar as complicações que podem levar ao óbito (Sunnd; Gladwin; Novelli, 2019).

Estima-se que o nascimento de crianças com AF seja de aproximadamente 300000 por ano, com a maior parte desse número na África subsaariana. Além disso, Nigéria,

República Democrática do Congo e Índia representam metade dos casos de AF do mundo devido principalmente ao endemismo da malária (Figura 2). No Brasil, a prevalência da AF se dá na região norte e nordeste, principalmente em afrodescendentes e populações quilombolas. Para o estado do Ceará, 467 casos foram registrados durante o período de 1964 a 2018 (Kato *et. al.*, 2018; Mburu; Odame, 2019; Dos Santos *et al.*, 2021).

Figura 2 - Prevalência da anemia falciforme no mundo.



Fonte: Adaptado de Colombatti, Birkegård, Medici (2022). A prevalência da anemia falciforme no mundo foi avaliada levando em consideração publicações sobre a epidemiologia da doença. Os círculos foram colocados no centro de cada país, sendo deslocados para melhor visualização no caso de haver vários países juntos. Nos países em branco não há dados com relação à prevalência da doença.

1.2 Fisiopatologia da Anemia falciforme

O processo de polimerização da HbS dá início à falcização e para que ocorra é necessário que a hemoglobina esteja desoxigenada. O início da polimerização se dá por meio da ligação de um grupo isopropil da cadeia lateral de β Val6 em uma das cadeias da globina β^S de um tetrâmero de HbS com resíduos β Ala70, β Phe85 e β Leu88 de outro tetrâmero de HbS. Ligações subsequentes de tetrâmeros de HbS nesse agregado resultam em longos polímeros duplos em torno de uma estrutura central, formando cristais e causando alterações celulares na hemácia. Dessa forma, a falcização acarreta em uma mudança conformacional da hemácia para um estado alongado denominado drepanócito e esse processo dita toda a fisiopatologia da AF (Ress; Gibson, 2011; Hoeger; Harris, 2020).

Dentre as alterações celulares nas hemácias ocasionadas pela falcização está o aumento da viscosidade citoplasmática. As hemácias na AF possuem como característica uma permeabilidade catiônica muito alta que, por sua vez, provocam o efluxo de cálcio e influxo de potássio que culmina na desidratação celular. Dessa forma, a desidratação celular contribui para o aumento da rigidez da hemácia e o aumento intracelular das concentrações de HbS, levando à sua polimerização e hemólise. Os eritrócitos falciformes possuem menos capacidade de deformação que o eritrócito normal mesmo quando totalmente oxigenados. Como consequência, essas células impedem o fluxo sanguíneo normal por meio da interação entre si e com leucócitos, plaquetas e células endoteliais, culminando em oclusões microvasculares transitórias (Ress; Gibson, 2011; Lu *et. al.*, 2020).

A vaso-oclusão é decorrente de alterações no fluxo sanguíneo bem como da ativação celular e adesão ao endotélio. A hemólise causada pela falcização compromete o fluxo sanguíneo local, resultando em uma vaso-oclusão transitória. Como consequência, as hemácias expressam em sua superfície moléculas e *motifs* de adesão que normalmente não são expressos. Dentre as moléculas de adesão expressas destacam-se a fosfatidilserina (PS), molécula de adesão celular basal-1/*Lutheran* (BCAM-1/Lu) e molécula de adesão intercelular-4 (ICAM-4, do inglês *intercellular adhesion molecule-4*), as quais interagem com as células endoteliais (Kim *et. al.*, 2017; Sunnd; Gladwin; Novelli, 2019).

O aumento da expressão de moléculas de adesão celular pelos leucócitos, plaquetas e células endoteliais possibilita a interação com as hemácias por meio da formação de agregados celulares. Durante o processo de agregação, há aumento da expressão de molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1, do inglês *intercellular adhesion molecule-1*), molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1, do inglês *vascular cell adhesion molecule-1*), L-selectina, P-selectina e E-selectina causado pela diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). Como consequência, há ativação e aumento da adesão de neutrófilos, monócitos e plaquetas ao endotélio, principalmente em vênulas pós-capilares, propiciando o início da vaso-oclusão (Zhang *et. al.*, 2016; Nader; Romana; Connes, 2020).

Episódios repetidos de falcização contribuem para a diminuição da vida média das hemácias e consequente lise, causando hemólise intravascular. As hemácias lisadas liberam ferro e moléculas contendo ferro, como hemoglobina, heme e hemina, produtos considerados padrões moleculares associados a danos em eritrócitos (eDAMP). Há então a catalização da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais estão envolvidas na produção de

citocinas pró-inflamatórias, disfunção endotelial e estresse oxidativo devido à diminuição da biodisponibilidade de NO. Diante disso há o aumento da adesão entre hemácias e neutrófilos, processo responsável pelo quadro de anemia hemolítica crônica dos pacientes. A hemólise extravascular na AF ocorre pela fagocitose realizada por macrófagos em hemácias danificadas, especialmente no baço. Esse processo elimina os componentes celulares que podem ser reutilizados e acontece de forma mais lenta e gradual que a hemólise intravascular (Zago, Pinto, 2007; Rees, Gibson, 2011; Sundd *et. al.*, 2018; Ofori-Acquah, 2020).

1.3 Inflamação na Anemia falciforme

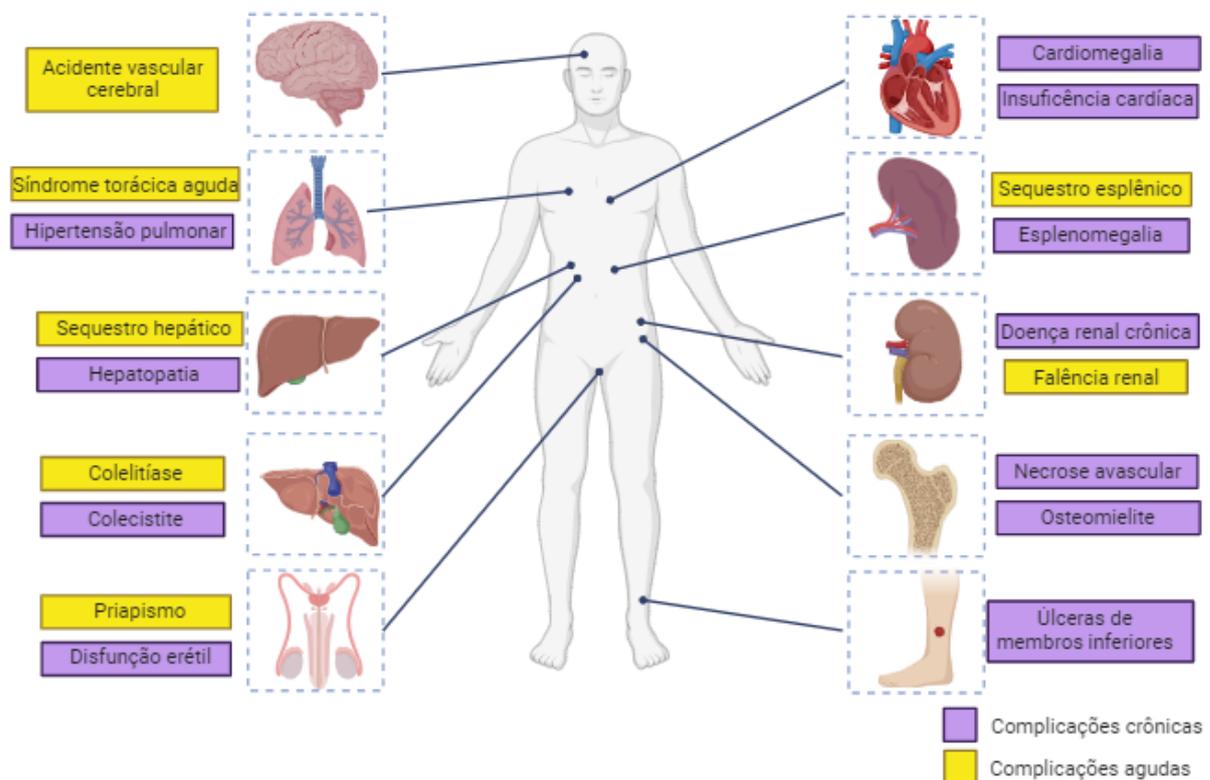
A inflamação na AF pode ser causada pelas lesões de isquemia-reperfusão decorrentes da vaso-oclusão. Os repetidos episódios de vaso-oclusão e reperfusão contribuem para a lesão de isquemia-reperfusão, cujas consequências são hipóxia transiente, geração de ERO, disfunção microvascular, ativação das respostas imunes inatas e adaptativas e morte celular. As ERO contribuem para a liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET, do inglês *neutrophil extracellular trap*), promovendo a ativação de respostas imunes inatas, dano tecidual e liberação de padrões moleculares associados a dano (DAMP). Dessa maneira, há ativação de complexos inflamassoma com posterior liberação e ativação de IL-1 β e IL-18. A ativação de inflamassoma ainda leva à cascata de eventos responsáveis pela ativação de neutrófilos e plaquetas, aumentando a expressão de E-selectina, P-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, promovendo a vaso-oclusão (Gladwin; Solomon; Ofori-Acquah, 2014; Sundd; Gladwin; Novelli, 2018; Toledo *et. al.*, 2019).

Os pacientes com AF são acometidos com anemia hemolítica, fato esse que também contribui para os processos inflamatórios. As concentrações aumentadas de heme na circulação ativa as células endoteliais e juntamente com sua forma oxidada, heme, ligam-se a um complexo de receptor Tipo Toll-4 e diferenciador mieloide-2 (TLR4/MD-2), resultando na produção de citocinas e quimiocinas induzidas por NF- κ B. Ainda, a heme circulante estimula a liberação de NET, causando a liberação de DAMPs, ativação da via de sinalização de interferon-I e indução de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Esses processos em conjunto propiciam as crises de vaso-oclusão (Gladwin; Solomon; Ofori-Acquah, 2014; Sundd; Gladwin; Novelli, 2018; Toledo *et. al.*, 2019).

1.4 Complicações clínicas da Anemia Falciforme

A hemólise crônica e a frequência de crises vaso-oclusivas são determinantes no perfil clínico da AF, que, por sua vez, é bastante heterogêneo. Ainda, a AF possui complicações clínicas sistêmicas, visto que são capazes de atingir uma diversidade de órgãos, principalmente devido aos processos inflamatórios instaurados. Dessa forma, as complicações clínicas observadas podem ser classificadas em i) agudas: acidente vascular cerebral (AVC), síndrome torácica aguda (STA), crises de vaso-oclusão, sequestro hepático, sequestro esplênico, colecistite, priapismo e falência de órgãos; ou ii) crônicas: hipertensão pulmonar, necrose avascular, úlceras de membros inferiores, hepatopatia, esplenomegalia, colelitíase e doença renal, sendo responsáveis pela diminuição da expectativa de vida desses pacientes em relação à população geral (Figura 3) (Darbari; Sheehan; Ballas, 2020; Onimoe; Rotz, 2020).

Figura 3 – Complicações clínicas da anemia falciforme.



Fonte: elaborado pelo autor. A anemia falciforme é uma doença com complicações multissistêmicas, podendo afetar mais de um órgão por vez. As complicações podem ser classificadas como agudas ou crônicas e ambas necessitam de cuidados médicos a fim de evitar o óbito.

As complicações agudas na AF são tempo-dependente, de forma que os pacientes que as apresentam necessitam de um rápido atendimento e/ou intervenção terapêutica, pois caso contrário, podem ser fatais (Pinto *et. al.*, 2019; Onimoe; Rotz, 2020).

A STA é definida como uma combinação de sintomas respiratórios (tosse, chiado, dor no peito) e febre com evidências de novos infiltrados pulmonares em raio X de tórax. É uma das causas mais comuns de admissão hospitalar na AF, sendo considerada a principal causa de morte prematura desses pacientes juntamente com a hipertensão pulmonar. Os fatores de risco para o desenvolvimento de STA incluem infarto por trombose *in situ*, infecções por *Streptococcus pneumoniae*, procedimentos cirúrgicos, necrose avascular, anemia aguda, isquemia mesentérica causado por crises de vaso-oclusão e elevada contagem de leucócitos (Pinto *et. al.*, 2019; Desai; Machado; Cohen, 2022).

O AVC é um evento agudo cerebral que pode acometer crianças e adultos com AF e é classificado como isquêmico, hemorrágico ou silencioso. O AVC silencioso ocorre em crianças por meio de pequenos infartos detectáveis apenas por ressonância magnética. Dessa forma, as crianças geralmente não apresentam sintomas neurológicos agudos. O AVC isquêmico é mais comum em crianças entre dois e nove anos e adultos, possuindo como fatores de risco baixos níveis de Hb, STA recente e meningite. O AVC hemorrágico ocorre mais em adultos entre 20 e 29 anos, está associado com uma taxa mortalidade de 26% em pacientes com AF e possui como fatores de risco histórico de STA, baixa contagem de leucócitos e níveis diminuídos de Hb. Ainda, a anemia aguda e a sepse são fatores que podem desencadear AVC nesses pacientes (Redding-Lallinger; Knoll, 2006; Tanabe *et. al.*, 2019).

As crises de dor ou crises de vaso-oclusão destacam-se entre as complicações agudas da AF por serem a principal morbidade associadas a doença e maior causa de hospitalização. As crises de vaso-oclusão possuem início repentino, com dor descrita como latejante e aguda. Ocorrem principalmente na região lombar, articulações e extremidades do corpo, podendo durar até uma semana, com picos de dor no terceiro dia. Dentre as consequências clínicas associadas às crises de vaso-oclusão estão a STA, o AVC e danos em múltiplos órgãos que podem resultar em óbito. Nesse contexto, a identificação desses episódios de dor auxilia no tratamento e junto com a prevenção pode impactar o curso natural da doença (Darbari; Sheehan; Ballas, 2020).

A anemia aguda na AF pode se manifestar como crise aplástica e, juntamente com o sequestro esplênico, causa diminuição nas concentrações basais de hemoglobina em pelo menos 2 g/dL. O sequestro esplênico é resultado de um rápido acúmulo de drepanócitos no baço, sendo comumente acompanhado de quadro infeccioso. Dentre os sintomas apresentados, destacam-se: febre, cefaleia, dispneia, taquicardia, infecções respiratórias e/ou gastrointestinais. O sequestro hepático ocorre devido ao acúmulo de drepanócitos no fígado por meio da fagocitose das células de Kupffer e tem como sintomas dor no quadrante superior direito abdominal, icterícia e febre. Nesse contexto, em ambos os casos o paciente pode necessitar de transfusão sanguínea (Pinto *et. al.*, 2019; Suddle, 2019; Lahoz *et al.*, 2022).

A colecistite é uma complicação hepatobiliar da AF resultante da inflamação da vesícula biliar cuja causa é a obstrução do duto biliar devido à presença de cálculos biliares e acúmulo de bile. A colecistite é advinda do aumento da pressão intramural com redução da saída da secreção biliar, levando à uma fase de isquemia que desencadeia inflamação. Os cálculos biliares podem ser constituídos de colesterol ou bilirrubina, sendo este responsável pela coloração preta e maior frequência na AF. Os sintomas observados incluem dor no quadrante superior direito abdominal, febre e náusea. Atualmente, o tratamento recomendado para a colecistite é a remoção da vesícula biliar, ou colecistectomia (Walter, 2022).

O priapismo é uma complicação geniturinária da AF que consiste em ereção dolorosa prolongada sem relação com desejos sexuais. Essa condição é causada pela vaso-oclusão que leva à obstrução da drenagem do fluxo sanguíneo no pênis, prolongando a ereção. Com relação a sua duração, o priapismo pode ser classificado em tipo I ou priapismo prolongado, com duração menor que três horas, e tipo II ou priapismo descontinuado, com duração menor que uma hora. O tratamento geralmente deve ser feito de maneira imediata para evitar fibrose, cuja consequência pode ser a disfunção erétil (Pinto *et. al.*, 2019; Alvaia *et. al.* 2020).

A falência de órgãos é uma complicação aguda pode ocorrer devido à disfunção endotelial e acomete órgãos como pulmão, fígado ou rins, podendo ser multissistêmica. Geralmente, a falência de órgãos ocorre durante uma crise de vaso-oclusão e os sintomas apresentados pelo paciente são: febre, insuficiência respiratória, hepática e renal juntamente com indicativos laboratoriais como queda brusca de hematócrito e da contagem de plaquetas (Onimoe; Rotz, 2020; Ruiz *et. al.* 2022).

A incidência das complicações crônicas da AF aumenta conforme a idade, mas o início pode ocorrer mais cedo. Além das dores crônicas presentes durante toda a vida, os pacientes com AF podem desenvolver hipertensão pulmonar, necrose avascular, úlceras de perna, hepatopatia, esplenomegalia, colelitíase, danos em órgãos como coração, pulmões, fígado e rins e doença renal (Pinto *et. al.*, 2019; Onimoe; Rotz, 2020).

As doenças de articulações ósseas incluem osteomielite, necrose avascular e osteoporose, podendo resultar em fraturas por compressão. A osteomielite ocorre normalmente em ossos longos como o fêmur, tíbia e úmero devido a infecções por *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*. A necrose avascular está relacionada às crises de vaso-oclusão, resultante de necrose óssea secundária à isquemia. Essa condição afeta frequentemente a cabeça do fêmur e articulação do ombro e embora seja assintomática até seu estágio mais avançado, uma vez que os sintomas se desenvolvem há uma rápida progressão. Nos estágios mais iniciais o tratamento pode ser realizado por meio de fisioterapia, mas quando o paciente é acometido com dor e comprometimento funcional se torna necessária intervenção cirúrgica (Pinto *et. al.*, 2019; Daltro *et. al.*, 2020; Onimoe; Rotz, 2020).

As úlceras de membros inferiores são complicações cutâneas bastante comuns na AF, afetando principalmente adultos. A patogênese da úlcera de perna é multifatorial e complexa, estando relacionada com drepanócitos rígidos na microcirculação, infecções bacterianas locais, insuficiência venosa, trombose e hipóxia. O local mais acometido é o maléolo, visto que possui pele fina, menos gordura subcutânea e diminuição do fluxo sanguíneo. As úlceras de perna causam dores intensas e contínuas, e, juntamente com altas taxas de reincidência, afetam negativamente a qualidade de vida do paciente (Pinto *et. al.*, 2019; Granja *et. al.*, 2020; Onimoe; Rotz, 2020).

O sistema hepatobiliar é comumente afetado na AF, de forma que o dano hepático ocorre em cerca de 10% dos pacientes adultos. As complicações crônicas podem se apresentar como hepatite autoimune, hepatite viral, sobrecarga de ferro, colangiopatia falciforme ou colelitíase. A fisiopatologia envolvida no dano hepático está relacionada com a falcização e consequente obstrução sinusoidal e isquemia dos hepatócitos ou dos dutos biliares. A esplenomegalia é resultante de repetidos infartos devido a crises de vaso-oclusão recorrentes, o que leva à asplenia funcional. A colelitíase é causada pelo acúmulo de formação de cálculos biliares pigmentados em decorrência da hiperbilirrubinemia crônica advinda da hemólise

crônica. A formação de cálculos biliares é mais comum em pacientes mais velhos, com prevalência alcançando 50% aos 22 anos de idade e é responsável por altas taxas de mortalidade na AF. Os sintomas apresentados são dor abdominal, náuseas, vômitos e febre e o tratamento mais indicado é a colecistectomia (Pontes *et. al.*, 2017; Pinto *et. al.*, 2019; Onimoe; Rotz, 2020; Allali *et. al.*, 2021).

Os rins são um dos órgãos mais afetados pela AF, visto que o microambiente da medula renal promove as condições para polimerização da HbS, propiciando o início da cascata de eventos fisiopatológicos da doença. As alterações renais se iniciam precocemente, por meio de hipostenúria, poliúria e enurese. Além disso, a doença renal na AF pode ocorrer devido a danos tubulares, os quais podem propiciar as crises de vaso-oclusão devido a acidose metabólica. A doença renal crônica atinge principalmente jovens adultos, de forma que a deterioração da função renal contribui substancialmente para o risco de morte após os 40 anos de idade (Pinto *et. al.*, 2019; Onimoe; Rotz, 2020).

1.5 Tratamento

A hidroxiureia é a principal terapia utilizada na AF, visto que possui efeitos laboratoriais e clínicos benéficos, incluindo a redução da morbidade e mortalidade dos pacientes. Seu mecanismo de ação envolve a indução de hemoglobina fetal (HbF), um dos principais moduladores da doença, responsável por diminuir as concentrações de HbS e, conseqüentemente, sua polimerização. A hidroxiureia atua inibindo de forma reversível a enzima ribonucleotídeo redutase, atuando como um agente citostático da fase S do ciclo celular. Embora o mecanismo exato pelo qual há a indução de HbF não tenha sido elucidado, foi sugerido que a hidroxiureia atua sobre os progenitores eritróides de rápida proliferação, causando a eritropoiese de estresse. Além da indução de HbF, os efeitos benéficos da hidroxiureia na AF incluem o melhoramento da reologia sanguínea, diminuição de hemólise, aumento da produção de NO e redução da inflamação (Dong; McGann, 2021).

Devido ao histórico da utilização de hidroxiureia para o tratamento de câncer, seus efeitos a curto e longo prazo são questionados na AF. Isso se deve ao fato de o medicamento ter efeito mielossupressor, de forma que seu uso a longo prazo possa causar exaustão da medula óssea. Embora administrada em crianças e adultos, a suspensão de hidroxiureia é recomendada para pacientes gestantes. Os efeitos colaterais relacionados ao medicamento são

indicativos de suspensão temporária e incluem desconforto gastrointestinal, úlceras de pele e hiperpigmentação de unhas e pele (McGann, Ware, 2015; Dong; McGann, 2021).

A AF apresenta uma diversidade clínica notável e por conta disso o paciente deve receber cuidados abrangentes. Diferentes estratégias terapêuticas são utilizadas para tratar as manifestações clínicas como anti-inflamatórios, antiplaquetários, antibióticos ou até mesmo a transfusão de concentrado de hemácias para aumentar os níveis de hemoglobina A e amenizar os sintomas. Dentre os tratamentos alternativos para a AF, o crizanlizumab é responsável pela redução da incidência de episódios vaso-oclusivos, mas não se mostrou capaz de melhorar totalmente as manifestações clínicas da doença. Uma segunda alternativa é o transplante halogênico de medula óssea, mas menos de um quinto dos pacientes elegíveis possui um doador compatível com antígeno leucocitário humano. Por fim, a utilização de anticorpos monoclonais e terapia gênica como CRISPR-Cas9 estão sendo consideradas como novas formas de tratamento para a AF (Baroncini *et. al.*, 2016; Ataga *et. al.*, 2017; Kato *et. al.*, 2018; Frangoul *et. al.*, 2020; Mangla *et. al.* 2022).

1.6 Moduladores genéticos da anemia falciforme e polimorfismos

Os haplótipos dos genes que codificam as cadeias β da hemoglobina atuam como moduladores genéticos da doença, visto que estão associados com diferentes concentrações de HbF e condicionam a diversidade clínica dos pacientes. Existem cinco haplótipos identificados: Bantu, Benin, Camarões, Senegal e Árabe-Indiano (Asiático). Dentre estes, o Bantu está associado com curso clínico mais grave, enquanto o Árabe-Indiano com o menos grave. Nesse contexto, polimorfismos genéticos podem estar relacionados com diferentes fenótipos da doença, visto que apenas os haplótipos não são capazes de explicar a heterogeneidade clínica e laboratorial (Balasubramanian, 2004; Steinberg, 2009; Serjeant; Vichinsky, 2018).

Outros fatores genéticos podem influenciar o perfil clínico dos pacientes com AF. Destacam-se entre eles os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) devido à sua maior frequência e possibilidade de ser clinicamente significativos a depender de sua posição. Na AF, alguns estudos demonstram associações entre SNP de *BCL11A* com aumento nos níveis de HbF; SNP do gene haptoglobina com o dano endotelial devido à formação de ERO e associação com risco de AVC; e SNP no gene do fator de transcrição de crescimento beta (TGF- β) com úlceras de membros inferiores e AVC, validando a importância da investigação

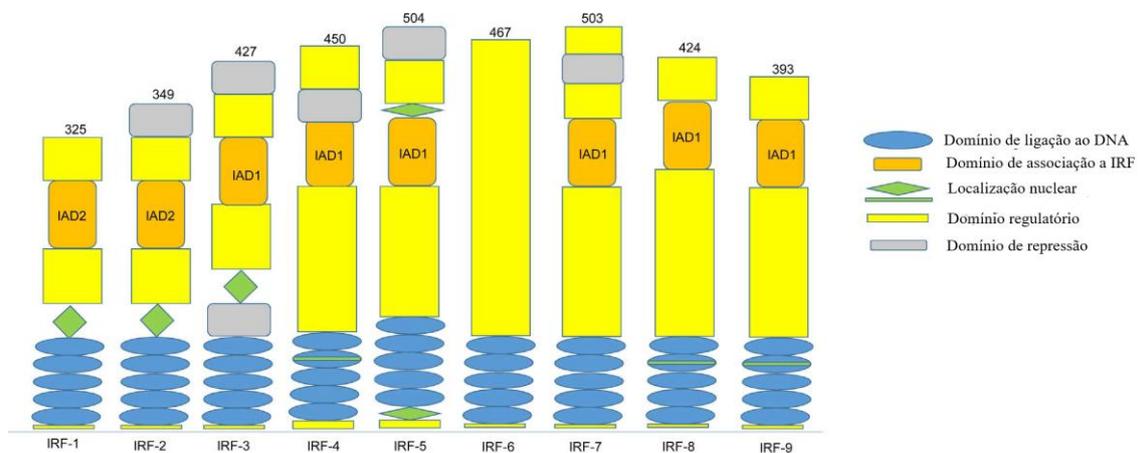
dessas relações em vários aspectos da doença (Balasubramanian, 2004; Sebastiani *et. al.*, 2005; Elliot *et. al.*, 2007; Torres *et. al.*, 2013; Chaouch *et. al.*, 2016b; Gilli *et. al.*, 2016; Afifi *et. al.*, 2019; Edwards *et. al.*, 2022).

1.7 Família dos Fatores Reguladores de Interferon (IRF)

Os fatores de transcrição controlam a expressão de conjuntos diversos de genes, atuando como importantes reguladores da defesa do hospedeiro por meio das respostas celulares. Sua funcionalidade está atrelada às suas modificações e/ou interações com outros fatores de transcrição que são coexpressos e/ou ativados na célula. Dessa forma, eles possibilitam uma rápida alteração e expressão de genes essenciais para combater patógenos extracelulares, podendo ser relacionados também com as respostas inflamatórias (Taniguchi *et. al.*, 2001).

Os fatores reguladores de interferon (IRF) pertencem a uma família de fatores de transcrição que possui nove membros descritos, os quais compartilham um domínio de ligação ao DNA (DBD: *DNA Binding Domain*) composto por 115 aminoácidos na região amino-terminal com cinco resíduos de triptofano altamente conservado e um domínio regulatório C-terminal menos conservado. Os IRF interagem entre si e com outros fatores de transcrição, modificando sua atividade de ligação específica à sequência e a formação de complexos de iniciação da transcrição (Figura 4). Devido às suas funções na regulação do desenvolvimento e na atividade de células hematopoiéticas, os IRF estão entre as respostas imunes inatas e adaptativas (Taniguchi *et. al.*, 2001; Battistini, 2009; Sundararaj; Casarotto, 2021).

Figura 4 - Organização estrutural dos genes de fatores reguladores de interferon (IRF).



Fonte: Adaptado de Chistiakov *et. al.* (2018). Cada IRF possui em sua região N-terminal o domínio de ligação ao DNA com 5 resíduos de triptofano bem conservados. Os domínios de associação a IRF permitem a interação uns com os outros. O domínio de localização nuclear é responsável pela sinalização do IRF ao núcleo. Domínios de regulação e repressão estão localizados na porção C-terminal.

1.8 Fator Regulador de Interferon-1

O fator regulador de interferon 1 (*IRF1*) foi o primeiro membro da família a ser identificado e está localizado na região cromossômica 5q31.1. Possui na região de ligação ao DNA arquitetura alfa/beta formada por três hélices α , folhas β antiparalelas de quatro fitas e três alças longas. Essa estrutura secundária do domínio de ligação ao DNA é compartilhada com outros membros da família, sugerindo o reconhecimento de sequências de DNA similares, mas não idênticos, como elemento de resposta estimulado por interferon (ISRE), sequência de consenso de interferon (ICS), IRF-E e domínio regulatório positivo (PRD) (Willman *et. al.*, 1993; Battistini, 2009; Shi *et. al.*, 2011; Chistiakov *et. al.*, 2016; Zenke; Muroi; Tanamoto, 2018; Salem; Salem; Gross, 2020).

O gene *IRF1* é expresso constitutivamente em baixos níveis em linfócitos, células dendríticas, monócitos e macrófagos e é induzido por infecções virais, bactérias, citocinas, como IL-1, IL-6, IL-12 e interferons do tipo I e II. A proteína IRF-1 é instável, com uma vida média de aproximadamente 30 minutos (Battistini, 2009; Shi *et. al.*, 2011; Chistiakov *et. al.*, 2016; Zenke; Muroi; Tanamoto, 2018; Salem; Salem; Gross, 2020).

O *IRF1* possui funções importantes na regulação do crescimento celular, apoptose, desenvolvimento de várias células do sistema imune e na produção de citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, o *IRF1* é considerado um importante mediador dos processos inflamatórios, tornando-o candidato para estudos que avaliem a relação desse gene com a clínica de doenças inflamatórias (Battistini, 2009; Shi *et. al.*, 2011; Chistiakov *et. al.*, 2016; Wang *et. al.*, 2016; Zenke; Muroi; Tanamoto, 2018; Salem; Salem; Gross, 2020).

Polimorfismos de nucleotídeo único de *IRF1* foram avaliados em diferentes doenças devido à sua ampla funcionalidade, sobretudo nos processos inflamatórios. Os SNP rs121912469 e rs127912470 foram associados com o risco aumentado do desenvolvimento de câncer gástrico, enquanto o rs56288038 foi relacionado com a diminuição da taxa de sobrevivência após cirurgia na doença. Na Doença de Chron, o SNP rs11242115 esteve associado ao desenvolvimento da doença, embora não tenha sido possível estabelecer

funcionalidade do polimorfismo na fisiopatologia. Nesse contexto, é notável a diversidade de estudos que visam estabelecer funções de SNP de *IRF1* em diferentes doenças (Eason; Shepherd; Blanck, 1998; Nozawa *et. al.*, 1998; Onnie *et. al.*, 2006; Wang *et. al.*, 2016; Martin *et. al.* 2023).

O rs839 corresponde a um SNP de *IRF1* no qual ocorre a substituição de uma base nitrogenada C por T na posição 132483434 do cromossomo 5. Embora esse polimorfismo tenha como consequência mais grave a formação de uma variante da região 3' não traduzida do RNA, suas consequências clínicas ainda não foram determinadas. Estudos envolvendo o rs839 indicam sua participação como preditor genético a efeitos adversos após vacinação contra tétano, coqueluche acelular e varíola. Ainda, um estudo envolvendo 452 indivíduos com tuberculose demonstrou associação entre o SNP rs839 e susceptibilidade à tuberculose (Reif *et. al.*, 2008; Ding *et. al.* 2012; Lin, He, 2014; Whitaker, Ovsyannikova, Poland, 2015; Ma *et. al.*, 2022; Martin *et. al.* 2023).

Na AF, uma provável função de *IRF1* foi evidenciada por Zanette *et. al.* (2018), que identificaram a atuação desse gene como regulador de desfechos da doença, incluindo englobamento celular, agregação de células sanguíneas e inflamação. Entretanto, não existem relatos que relacionem o SNP de *IRF1* (rs839) com a AF. Não obstante, é possível que esse polimorfismo esteja associado com as complicações clínicas da doença, visto que a AF cursa com inflamação crônica e o *IRF1* está localizado em uma região cromossômica composta por vários genes de citocinas. Nesse cenário, o presente estudo teve como finalidade fornecer informações sobre a relação de um SNP nesse gene na população com e sem a doença, buscando associá-lo com biomarcadores de mau prognóstico em pacientes com AF.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência do polimorfismo do fator regulador de interferon 1 (rs839) em pacientes com anemia falciforme e sua associação com biomarcadores clínicos e de inflamação.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil sociodemográfico, clínico e laboratorial dos pacientes com anemia falciforme;
- Determinar a frequência alélica e distribuição genotípica do polimorfismo do gene *IRF1* (rs839) em pacientes com anemia falciforme e grupo controle;
- Associar o polimorfismo de *IRF1* (rs839) com os biomarcadores de inflamação em pacientes com anemia falciforme em uso ou não da hidroxiureia;
- Associar o polimorfismo de *IRF1* (rs839) com os níveis de hemoglobina fetal, o grau de anemia e com as complicações clínicas em pacientes com anemia falciforme.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos

O projeto foi submetido Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (Hemoce) e aprovado conforme parecer 6.185.474. Todos os participantes envolvidos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.2. Casuística

O estudo foi desenvolvido no período entre outubro de 2022 a julho de 2023. Foram recrutados 68 pacientes diagnosticados com anemia falciforme que estavam em acompanhamento ambulatorial no Hemoce e 82 doadores de sangue voluntários (grupo controle) com o perfil de hemoglobina AA. Os pacientes tiveram amostras de sangue coletadas durante atendimento ambulatorial no período do estudo.

Os pacientes com anemia falciforme foram estratificados quanto:

À utilização de hidroxiureia: uso contínuo há um ano ou mais (dose 8 a 30mg/kg/dia); e não uso (interrupção há mais de três meses) (Maia Filho *et. al.*, 2018);

Ao grau de anemia: leve a moderada ($Hb \geq 8g/dL$) e grave ($Hb < 8g/dL$) (Aban *et. al.*, 2017);

À ocorrência de crises vaso-oclusivas: grave (≥ 3 crises de dor intensa que exigiram cuidados no último ano) e não grave (< 3 crises por ano) (Darbari *et. al.*, 2012).

3.3. Seleção de amostras

Os critérios de inclusão para os pacientes abrangeram indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos, diagnóstico confirmado por eletroforese de hemoglobina e/ou por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e estado estacionário da doença, ou seja, ausência de episódios de dores aguda e/ou doenças infecciosas nas quatro semanas antecedentes ao estudo; de admissão hospitalar nos três dias antecedentes ao estudo; e de transfusão sanguínea nos quatro meses anteriores ao estudo (Ballas, 2012). Foram excluídos os pacientes com dados incompletos no prontuário, etilistas e gestantes.

Os critérios de inclusão para o grupo controle abrangeram indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos e perfil de hemoglobina HbAA. Consideraram-se inelegíveis os indivíduos etilistas, obesos e fumantes.

3.4. Coleta de dados e amostras

Obtiveram-se os dados epidemiológicos (idade e sexo), antropométricos (peso, altura e índice de massa corpórea - IMC), clínicos (crises vaso-oclusivas graves, STA, AVC, úlceras de membros inferiores, necrose avascular, sequestro esplênico, esplenomegalia, hepatomegalia, doença renal, priapismo, colelitíase e colecistite), farmacológicos (uso de hidroxiureia, dose e tempo) e laboratoriais (hemograma, contagem de reticulócitos e perfil de hemoglobina) por consulta em prontuários. Foram considerados biomarcadores de inflamação os seguintes parâmetros: Proteína C Reativa, Leucócitos, neutrófilos, relação neutrófilos/linfócitos, monócitos, plaquetas e ferritina. O Índice de Massa Corpórea (IMC) foi determinado e classificado de acordo com Stevens e colaboradores (2012).

Coletaram-se duas amostras de 4 mL de sangue periférico, sendo uma em tubo com gel separador para as dosagens de Proteína C reativa, e outra em tubo com EDTA para extração de DNA e ensaio de discriminação alélica do polimorfismo de *IRF1* (rs839).

3.5. Extração de DNA de sangue periférico

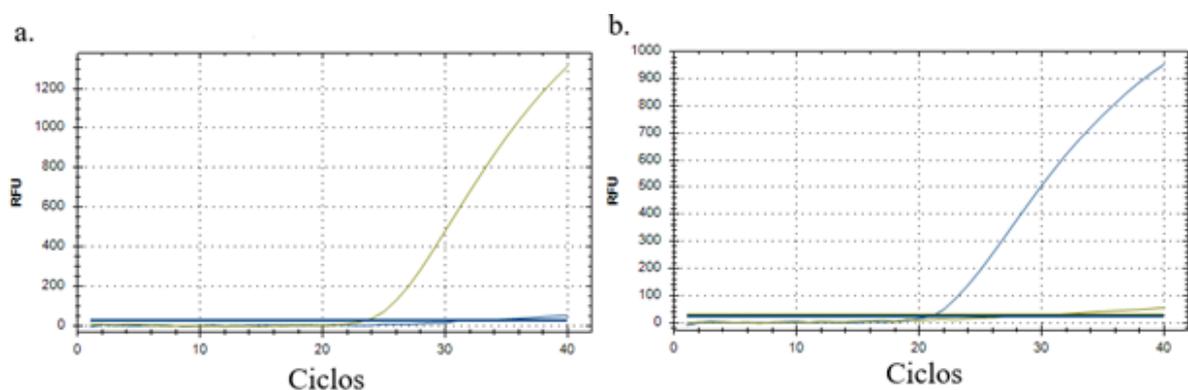
As amostras passaram por um processo inicial de lise de hemácias pela adição de 800µL de SDH diluente (CenterLab) gelado em alíquotas de 400µL de sangue periférico. Em seguida, adicionaram-se tampão fosfato-salina pH 7,2 (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) e Trizol LS Reagent R (Invitrogen, EUA) seguido por incubação a -80°C para lise de leucócitos. Adiante, adicionou-se clorofórmio para desnaturação de proteínas e, após centrifugação, obtiveram-se três fases distintas, nas quais foram adicionadas BEB (*Back Extraction Buffer*: 4M isotiocianato de guanidina + 50mM citrato de sódio di-hidratado pH 8,5 + 1M Tris-HCL pH 8,0) para quebrar as cadeias de proteínas que se ligam aos ácidos nucleicos e prosseguiu-se para incubação sob agitação constante por 30 minutos com posterior adição de isopropanol e incubação a -20°C. A purificação do DNA se deu pela adição de etanol absoluto gelado seguido por centrifugação e a eluição em 20µL de água estéril deionizada (miliQ).

O DNA foi quantificado por espectrofotometria em analisador de microvolumes tipo *Nanodrop (ThermoScientific)* no comprimento de onda de 260nm e as concentrações de proteínas e outros contaminantes em 280nm. O grau de pureza foi determinado pela razão entre as absorbâncias obtidas em 260/280, as quais foram aceitas para posterior ensaio de discriminação alélica dos polimorfismos aquelas amostras com valores entre 1,7 e 2,0 (Wilfinger; Mackey; Chomczynski, 1997). Todas as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C.

3.6. Análise de polimorfismo rs839

O polimorfismo de nucleotídeo único de *IRF1* (rs839) foi analisado por ensaio de discriminação alélica por PCR em tempo real no *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, California, USA)* no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT). Utilizou-se o sistema *TaqMan*, o qual utiliza uma sonda fluorescente para detectar um produto específico de PCR conforme se acumula durante os ciclos. O alelo selvagem (C) esteve marcado com fluoróforo VIC (cor verde) e o alelo polimorfo (T) com fluoróforo FAM (cor azul) (Figura 5). Foram utilizados 5,0 µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix*, 2,75 µL de água ultrapura, 0,25 µL da sonda *TaqMan* e 2,0 µL de DNA da amostra (com concentração aproximada de 20 ng/µL). As reações foram incubadas em termociclador por 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, mais 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os resultados foram obtidos em gráficos por meio do programa *Bio-Rad CFX Manager*.

Figura 5 - Curvas de amplificação do polimorfismo de nucleotídeo único do gene *IRF1* rs839.



Fonte: Elaborada pelos autores. **a.** alelo selvagem C corado com VIC. **b.** alelo polimorfo T corado com FAM.

3.7. Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelos programas *IBM SPSS Statistics 22.0* (IBM, EUA) e *GraphPad Prism 6*. A frequência das variáveis categóricas foram verificadas pelo teste de qui-quadrado e teste exato de Fisher, enquanto as variáveis numéricas foram analisadas conforme a normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk ou *Skewness* e curtose. Variáveis não-paramétricas foram analisadas por Mann-Whitney, enquanto as paramétricas por teste t de amostras independentes. As variáveis numéricas foram expressas como média \pm desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil). As frequências alélicas de C (selvagem) e T (polimórfica) do SNP rs839 foram verificadas para Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) pelo programa *HW_TEST* v1.1, aplicando-se o teste de qui-quadrado de Pearson (Santos, Lemes e Otto, 2020). Em todas as análises as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

A idade média dos pacientes com anemia falciforme foi de 32,9 anos, sua maioria do sexo feminino (63,2%) e com peso normal (55,9%). O grupo controle apresentou idade média de 33,9 anos e a prevalência do sexo masculino (71,9%). Os pacientes apresentaram volume corpuscular médio (VCM), leucócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas elevados em relação ao grupo controle. Em contrapartida, os níveis de hemoglobina e a razão de neutrófilos/linfócitos estiveram diminuídos em comparação com o grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados sociodemográficos e laboratoriais de pacientes com anemia falciforme e grupo controle.

	Anemia Falciforme	Grupo Controle	P
Idade (<i>anos</i>)	32,9 (18 – 67)	33,9 (19 – 65)	0,592 ^a
Sexo (<i>n, %</i>)			<0,001^a
Masculino	25 (36,8)	59 (71,9)	
Feminino	43 (63,2)	23 (28,1)	
IMC (<i>n, %</i>)		N/A	
Baixo peso	8 (11,8)		
Peso normal	38 (55,9)		
Sobrepeso	12 (17,6)		
Obesidade	4 (5,9)		
Não consta	6 (8,8)		
Hemoglobina (g/dL)	9,3 (8,3 - 9,9)	14,5 (13,6 – 15,6)	<0,001^a
Volume Corpuscular Médio (fL)	106,4 (97 – 115)	89,7 (86,8 – 93,3)	<0,001^b
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	8,7 ± 3,6	7,3 ± 2,1	0,04^a
Neutrófilos (10 ³ /mm ³)	4,1 ± 2,3	4,6 ± 2,5	0,216 ^a
Linfócitos (10 ³ /mm ³)	3,2 (2,6 – 4,1)	2,1 (1,8 – 2,6)	<0,001^b
Monócitos (10 ³ /mm ³)	0,5 (0,4 - 0,8)	0,4 (0,3 - 0,5)	0,001^b
Plaquetas (10 ⁵ /mm ³)	3,3 (2,4 – 4,2)	2,11 (1,8 – 2,4)	<0,001^b
Reticulócitos (10 ⁵ /mm ³)	2,2 ± 1,0	N/A	
Reticulócitos (%)	8,9 ± 4,0	N/A	
Razão Neutrófilo/Linfócito	1 (0,8 – 1,4)	2 (1,5 – 2,5)	<0,001^b
Ferritina (ng/mL)	411 (201 – 725)	N/A	
Proteína C reativa (<i>n, %</i>)			0,016^c
< 6 mg/L	49 (41,2)	70 (58,8)	
≥ 6 mg/L	18 (69,2)	8 (30,8)	
Hemoglobina S (%)	74,6 ± 13,4	N/A	
Hemoglobina Fetal (%)	17,3 ± 12,0	N/A	
Hemoglobina A ₂ (%)	4,9 ± 0,8	N/A	

^aTeste t de Student para amostras independentes; ^bMann-Whitney; ^cQui-quadrado de Pearson; N/A: Não aplicável; IMC: Índice de Massa Corpórea. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão, mediana (intervalo interquartil) e frequência (porcentagem).

A maioria dos pacientes (70,6%) fazia uso de hidroxiureia de forma contínua, a dose foi apresentada com valores medianos de 21,8 mg/kg/dia e com tempo de uso variando de 1 a 11 anos. Colelitíase, úlceras de membros inferiores e crises de vaso-oclusão graves foram as complicações clínicas mais frequentes nos pacientes com anemia falciforme (41,1%,

30,9% e 26,5%, respectivamente), ao passo que acidente vascular cerebral, esplenomegalia e hepatomegalia foram as menos frequentes (5,9%, 7,3% e 7,3% respectivamente) (Tabela 2).

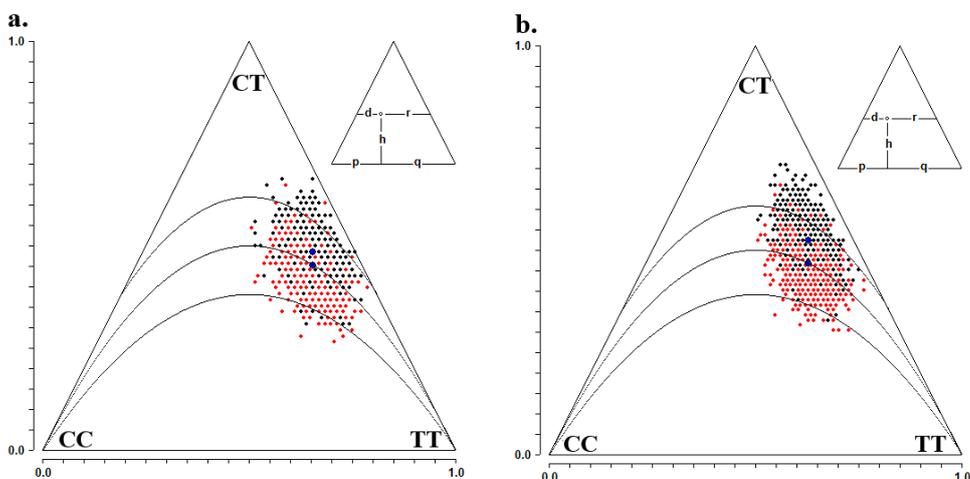
Tabela 2 – Uso de hidroxiureia e histórico de complicações clínicas de pacientes com anemia falciforme.

Uso de hidroxiureia (n, %)	48 (70,6)
Dose (mg/kg/dia)	21,8 (18,8 – 27,2)
Tempo de Uso	
De 1 a 5 anos	6 (8,8)
Mais que 5 anos	42 (61,8)
Anemia grave (n, %)	11 (16,2)
Crises de vaso-oclusão grave (n, %)	18 (26,5)
Síndrome torácica aguda (n, %)	13 (19,1)
Acidente vascular cerebral (n, %)	4 (5,9)
Úlceras de membros inferiores (n, %)	21 (30,9)
Necrose avascular (n, %)	10 (14,7)
Sequestro esplênico (n, %)	7 (10,3)
Esplenomegalia (n, %)	5 (7,3)
Hepatomegalia (n, %)	5 (7,3)
Doença renal (n, %)	8 (11,8)
Priapismo (n, %)	6 (24)
Colelitíase (n, %)	28 (41,1)
Colecistite (n, %)	8 (11,8)

Os dados estão apresentados como mediana (intervalo interquartílico) e frequência (porcentagem).

O polimorfismo de *IRF1* (rs839) esteve presente em 40 (58,8%) pacientes e em 52 (63,4%) indivíduos do grupo controle. As proporções dos genótipos estiveram de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (pacientes: $p = 0,509$; controle: $p = 0,267$) (Figura 6). Não houve diferença entre a frequência alélica e distribuição genotípica entre os grupos (Tabela 3).

Figura 6 - Gráfico ternário de equilíbrio de Hardy-Weinberg de pacientes com anemia falciforme e grupo controle.



Fonte: Elaborado pelo autor. CC: genótipo selvagem, CT: genótipo polimorfo em heterozigose, TT: genótipo polimorfo em homozigose. Distribuição genotípica esperada (pontos vermelhos) e observada (pontos pretos).

Tabela 3 – Frequência alélica e distribuição genotípicas do polimorfismo de *IRF1* rs839 em pacientes com anemia falciforme e grupo controle.

		Anemia Falciforme (n=68)	Grupo Controle (n=82)	P
Alelos	C	89 (65,4%)	103 (62,8%)	0,717
	T	47 (34,6%)	61 (37,2%)	
Genótipos	CC	28 (41,2%)	30 (36,6%)	0,847
	CT	33 (48,5%)	43 (52,4%)	
	TT	7 (10,3%)	9 (11%)	

Teste de qui-quadrado (χ^2). C: alelo selvagem, T: alelo polimorfo, CC: genótipo selvagem, CT/TT: genótipos polimorfos. Os dados estão apresentados como frequência (porcentagem).

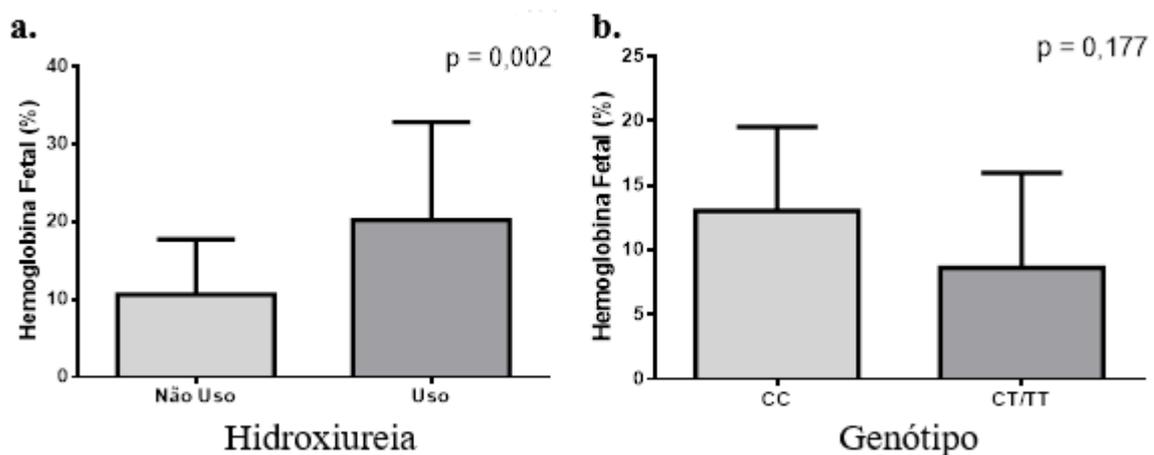
Não houve associação entre o uso de hidroxiureia e a frequência alélica ou distribuição genotípica do polimorfismo de *IRF1* (rs839) (Tabela 4). Os pacientes em uso de hidroxiureia apresentaram níveis elevados de hemoglobina fetal em relação aos que não utilizavam o medicamento. Entretanto, não houve diferença nos níveis de hemoglobina fetal nos genótipos do polimorfismo de *IRF1* (rs839) em pacientes que não faziam uso de hidroxiureia ($p = 0,177$) (Figura 7).

Tabela 4 - Associação entre frequência alélica e distribuição genotípica do polimorfismo rs839 e uso de hidroxiureia em pacientes com anemia falciforme.

Uso de hidroxiureia	Frequência alélica		p	Distribuição genotípica			p
	C	T		CC	CT	TT	
Sim	21 (80,8)	23 (76,7)	0,709 ^a	19 (67,9)	22 (66,7)	7 (100)	0,235 ^b
Não	5 (19,2)	7 (23,3)		9 (32,1)	11 (33,3)	0 (0)	

^a: Teste de qui-quadrado (χ^2); ^b: Teste exato de Fisher. C: alelo selvagem; T: alelo polimorfo; CC: genótipo selvagem; CT: genótipo polimorfo em heterozigose; TT: genótipo polimorfo em homozigose. Os dados estão apresentados como frequência (porcentagem).

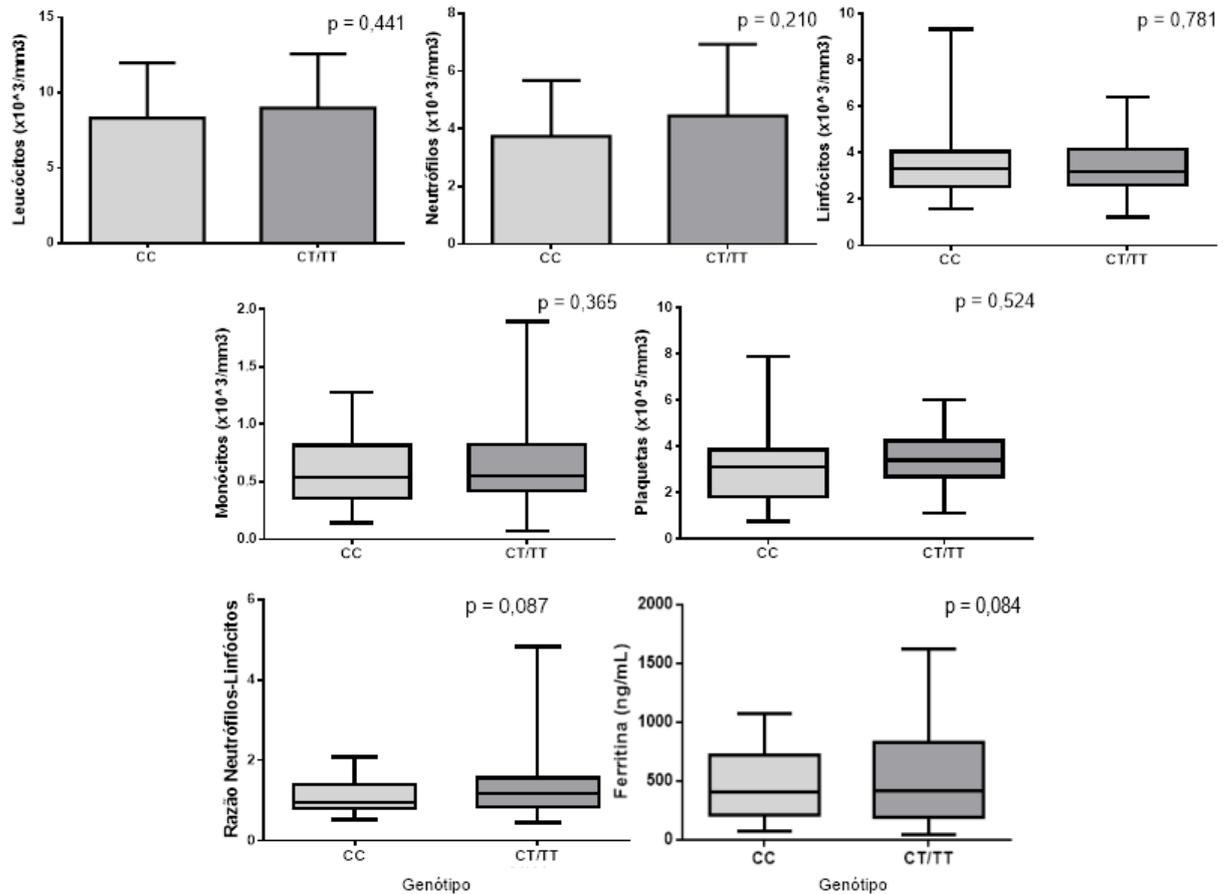
Figura 7 - Níveis de hemoglobina fetal em pacientes com anemia falciforme.



Fonte: Elaborada pelos autores. **a.** em relação ao uso de hidroxiureia e **b.** diferentes genótipos do polimorfismo de *IRF1* rs839 em pacientes que não fazem uso de hidroxiureia. CC: genótipo selvagem, CT/TT: genótipos polimorfos. Teste t de Student para amostras independentes.

Não houve associação entre a presença do polimorfismo e os biomarcadores de inflamação: leucócitos ($p=0,441$), neutrófilos ($p=0,210$), linfócitos ($p=0,781$), razão neutrófilos/linfócitos ($p=0,087$), monócitos ($p=0,365$), plaquetas ($p=0,524$), ferritina ($p=0,084$) e proteína C reativa ($p=0,523$) nos pacientes com anemia falciforme (Figura 8; Tabela 5).

Figura 8 - Biomarcadores de inflamação em pacientes com anemia falciforme independente do uso de hidroxiureia nos diferentes genótipos do polimorfismo de *IRF1* (rs839).



Fonte: Elaborada pelos autores. CC: genótipo selvagem, CT/TT: genótipos polimorfos. Teste t de Student para amostras independentes e Mann Whitney.

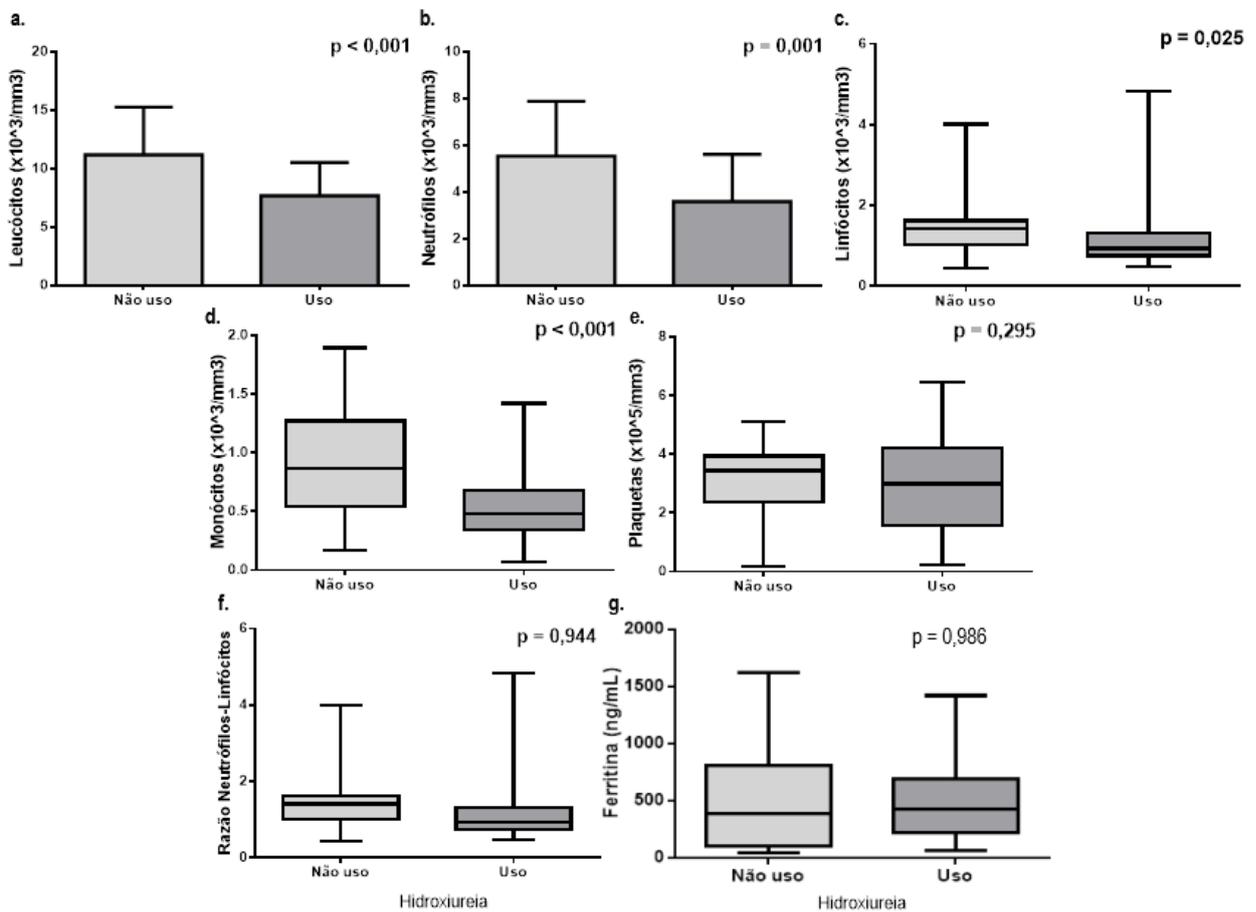
Tabela 5 - Associação entre frequência alélica e distribuição genotípica de rs839 com níveis de proteína C reativa em pacientes com anemia falciforme.

	Frequência alélica		p	Distribuição genotípica			P
	C	T		CC	CT	TT	
Proteína C reativa							
< 6 mg/L	56 (70,9)	28 (71,8)	1,000 ^a	21 (75)	23 (71,9)	5 (71,4)	1,000 ^b
≥ 6 mg/L	23 (29,1)	11 (28,2)		7 (25)	9 (28,1)	2 (28,6)	

^a: Teste de qui-quadrado (χ^2); ^b: Teste exato de Fisher. C: alelo selvagem; T: alelo polimorfo; CC: genótipo selvagem; CT: genótipo polimorfo em heterozigose; TT: genótipo polimorfo em homozigose. Os dados estão apresentados como frequência (porcentagem).

As contagens de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos estiveram elevadas nos pacientes que não faziam uso de hidroxiureia em comparação aos que não utilizavam o fármaco (Figura 9). Em contrapartida, não houve diferença entre a razão neutrófilos/linfócitos, contagem de plaquetas e níveis de ferritina nos pacientes com anemia falciforme em relação ao uso do medicamento.

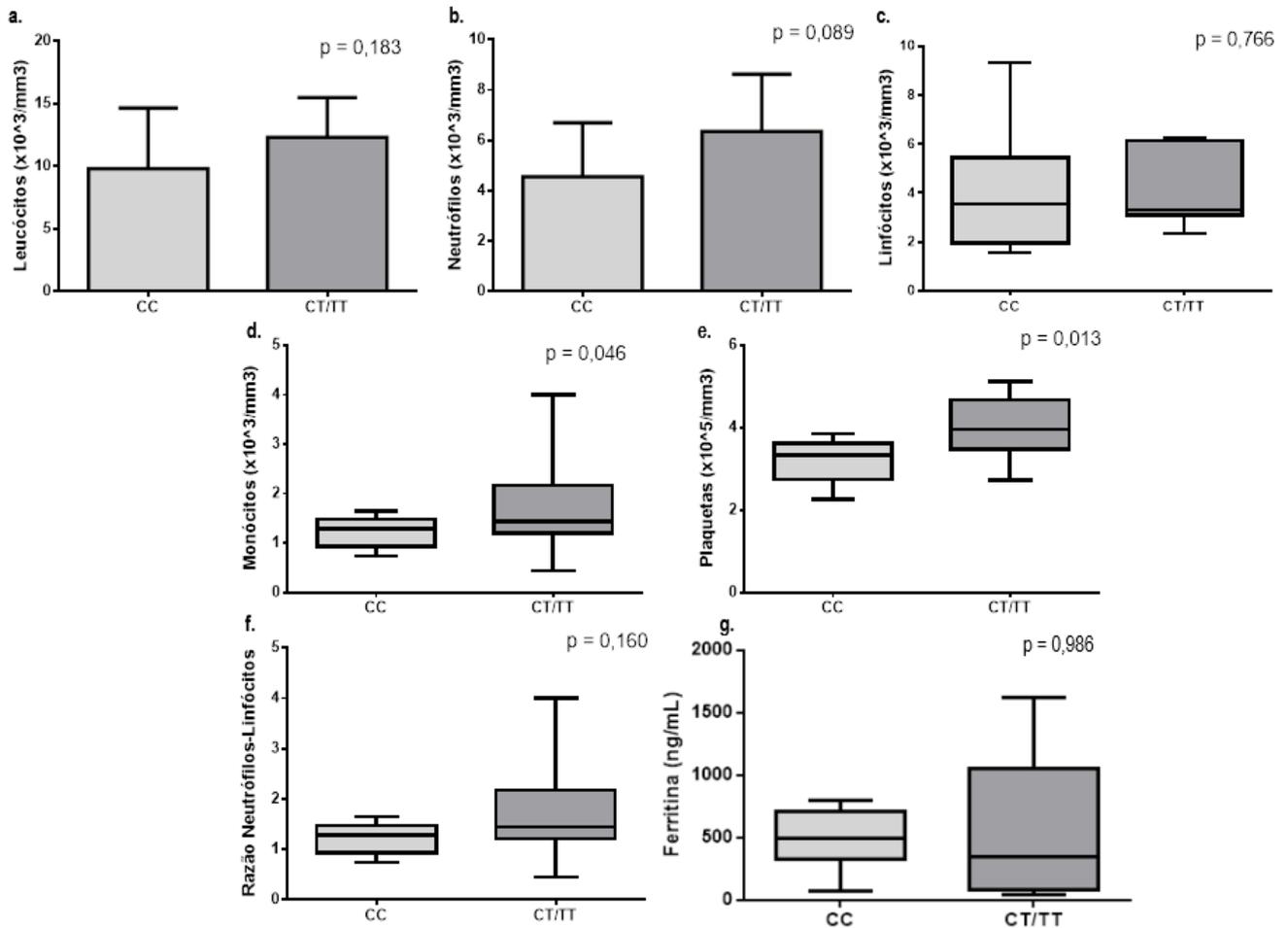
Figura 9 - Influência do uso de hidroxiureia sobre biomarcadores de inflamação em pacientes com anemia falciforme.



Fonte: Elaborada pelos autores. **a.** leucócitos, **b.** neutrófilos, **c.** linfócitos, **d.** monócitos, **e.** plaquetas, **f.** razão neutrófilos-linfócitos, **g.** ferritina. Teste t de Student para amostras independentes e Mann Whitney.

Ao avaliar os biomarcadores de inflamação em pacientes que não faziam uso de hidroxiureia verificou-se maior contagem de monócitos ($p = 0,046$) e de plaquetas ($p = 0,013$) nos pacientes com genótipo polimorfo (CT/TT) em comparação ao genótipo selvagem (CC) (Figura 10).

Figura 10 - Biomarcadores de inflamação em pacientes com anemia falciforme que não fazem uso de hidroxiureia nos diferentes genótipos do polimorfismo de *IRF1* (rs839).



Fonte: Elaborada pelos autores. **a.** leucócitos, **b.** neutrófilos, **c.** linfócitos, **d.** monócitos, **e.** plaquetas, **f.** razão neutrófilos-linfócitos, **g.** ferritina. CC: genótipo selvagem, CT/TT: genótipos polimorfos. Teste t de Student para amostras independentes e Mann Whitney.

Não houve associação entre a frequência alélica ou a distribuição genotípica do polimorfismo de *IRF1* (rs839) e o grau de anemia grave, ocorrência de crises-oclusivas graves, síndrome torácica aguda, acidente vascular cerebral, úlceras de membros inferiores, necrose avascular, sequestro esplênico, esplenomegalia, hepatomegalia, nefropatia falciforme, doença renal, priapismo e colelitíase em pacientes com anemia falciforme (Tabela 6). Em contrapartida, pacientes com o genótipo CC e CT apresentaram menor incidência de colecistite em relação aqueles com genótipo TT.

Tabela 6 - Associação entre frequência alélica e distribuição genotípica de rs839 com as complicações clínicas em pacientes com anemia falciforme.

	Frequência alélica		p	Distribuição genotípica			P
	C	T		CC	CT	TT	
Grau da anemia							
Moderada	77 (86,5)	37 (78,7)	0,327 ^a	25 (89,3)	27 (81,8)	5 (71,4)	0,348 ^b
Grave	12 (13,5)	10 (21,3)		3 (10,7)	6 (18,2)	2 (28,6)	
Crises vaso-oclusivas grave							
Sim	23 (25,8)	13 (27,7)	0,840 ^b	7 (25)	9 (27,3)	2 (28,6)	1,000 ^b
Não	66 (74,2)	34 (72,3)		21 (75)	24 (72,7)	5 (71,4)	
Síndrome torácica aguda							
Sim	17 (19,1)	8 (17,4)	0,822 ^b	5 (17,9)	7 (21,2)	1 (14,3)	0,907 ^b
Não	72 (80,9)	38 (82,6)		23 (82,1)	26 (78,8)	6 (85,7)	
Acidente vascular cerebral							
Sim	6 (6,7)	2 (4,3)	0,714 ^b	2 (7,1)	2 (6,1)	0 (0)	1,000 ^b
Não	83 (93,3)	45 (95,7)		26 (92,9)	31 (93,9)	7 (100)	
Úlcera de membros inferiores							
Sim	26 (29,9)	16 (34)	0,697 ^b	8 (28,6)	12 (36,4)	2 (28,6)	0,866 ^b
Não	61 (80,1)	31 (66)		20 (71,4)	21 (63,6)	5 (71,4)	
Necrose avascular							
Sim	13 (14,6)	7 (14,9)	1,000 ^b	4 (14,3)	5 (15,2)	1 (14,3)	1,000 ^b
Não	76 (85,4)	40 (85,1)		24 (85,7)	28 (84,8)	6 (85,7)	
Sequestro esplênico							
Sim	11 (12,4)	3 (6,4)	0,379 ^b	4 (14,3)	3 (9,1)	0 (0)	0,733 ^b
Não	78 (87,6)	44 (93,6)		24 (85,7)	30 (90,9)	7 (100)	
Esplenomegalia							
Sim	7 (7,9)	3 (6,4)	1,000 ^b	3 (10,7)	1 (3)	1 (14,3)	0,290 ^b
Não	82 (92,1)	44 (93,6)		25 (89,3)	32 (97)	6 (85,7)	
Hepatomegalia							
Sim	4 (4,5)	6 (12,8)	0,094 ^b	1 (3,6)	2 (6,1)	2 (28,6)	0,152 ^b
Não	85 (95,5)	41 (87,2)		27 (96,4)	31 (93,9)	5 (71,4)	
Doença renal							
Sim	11 (12,4)	5 (10,6)	0,791 ^b	3 (10,7)	5 (15,2)	0 (0)	0,654 ^b
Não	78 (87,6)	42 (89,4)		25 (89,3)	28 (84,8)	7 (100)	
Priapismo							
Sim	8 (25,8)	4 (21,1)	0,748 ^b	2 (22,1)	4 (20,8)	0 (0)	0,826 ^b
Não	23 (74,2)	15 (78,9)		7 (77,9)	9 (69,2)	3 (100)	
Colelitíase							
Sim	41 (46,1)	15 (31,9)	0,143 ^b	15 (53,6)	11 (33,3)	2 (28,6)	0,225 ^b
Não	48 (53,9)	32 (68,1)		13 (46,4)	22 (66,7)	5 (71,4)	
Colecistite							
Sim	9 (10,1)	7 (14,9)	0,415 ^b	4 (14,3)	1 (3)	3 (42,9)	0,015^b
Não	80 (89,9)	40 (85,1)		24 (85,7)	32 (97)	4 (57,1)	

^a: Teste de qui-quadrado (χ^2); ^b: Teste exato de Fisher; C: alelo selvagem; T: alelo polimorfo; CC: genótipo selvagem; CT: genótipo polimorfo em heterozigose; TT: genótipo polimorfo em homozigose. Os dados estão apresentados como frequência (porcentagem).

5 DISCUSSÃO

O sexo feminino foi predominante nos pacientes com AF, o que está em concordância com estudos da literatura (Ezenwa *et. al.*, 2014; da Cruz *et. al.*, 2016; dos Santos *et. al.*, 2021; Spira *et. al.*, 2022). Essa predominância pode estar relacionada com o perfil da população cearense, a qual é composta em sua maioria por mulheres (51,7%), visto que a AF não é uma doença ligada aos cromossomos sexuais e sim de caráter autossômico recessivo (da Cruz *et. al.*, 2016; IBGE, Censo demográfico, 2022).

No presente estudo houve predomínio do peso normal nos pacientes adultos com AF, o que está de acordo com Dickmen e colaboradores (2022) e Lamarre e colaboradores (2016). No entanto, Ali e colaboradores (2021) encontraram uma prevalência de baixo peso ao avaliar o estado nutricional de pacientes com AF em idade fértil. Vale ressaltar que são poucos os estudos na população adulta com AF que avaliam IMC, sendo mais frequentes na população infantil e na adolescência, fato atribuído a análise do impacto da doença no desenvolvimento dos mesmos (Odetunde *et. al.*, 2016; Alzharani *et. al.*, 2021; Jackson *et. al.*, 2022).

Os resultados dos exames laboratoriais apresentaram diferenças significativas entre os indivíduos com AF e o grupo controle. Os valores elevados de VCM apresentados pelos pacientes em comparação com o grupo controle são indicativos de macrocitose e podem estar relacionados com a boa aderência ao tratamento com hidroxiureia (Cançado; Jesus, 2007). Além disso, elevação nas contagens de leucócitos e linfócitos dos pacientes em relação ao grupo controle estão de acordo com a literatura que se devem principalmente ao efeito benéfico de hidroxiureia (Zahran, *et. al.* 2020; Ali *et. al.*, 2021).

No presente estudo, a razão de neutrófilos/linfócitos nos pacientes com AF foi significativamente inferior em comparação ao grupo controle, porém ambos apresentaram valores dentro dos parâmetros de referência (Zahorec, 2021). A razão de neutrófilos/linfócitos é calculada pela divisão entre seus valores absolutos e tem sido postulada como um marcador da inflamação (Alagbe; Olaniyi, 2019; Maharaj; Chang, 2023). Na AF, a elevação desse parâmetro tem sido associada com nefropatia falciforme e correlacionada com infecções bacterianas e infecções virais em pacientes com AF em crise de vaso-oclusão (Emokpae; Abdu; Gwaram, 2016; Maharaj; Chang, 2023). No presente estudo foram avaliados apenas pacientes em estado basal, portanto, nossos achados se contrapõem à literatura, na qual determina que a elevação da razão neutrófilos/linfócitos estão mais associados com a doença em sua forma aguda (Maharaj; Chang, 2023). O perfil da razão neutrófilos/linfócitos se manteve o mesmo independente do uso de hidroxiureia no presente estudo, fato que exclui a

interferência do medicamento na análise. Entretanto, esse resultado foi discordante com o estudo de Zahran e colaboradores (2020), que verificou uma diminuição na razão neutrófilos/linfócitos em pacientes com AF em uso de hidroxiureia.

Os níveis de ferritina sérica não sofreram influência do polimorfismo de *IRF1* rs839 nos pacientes com AF. A ferritina é descrita como um marcador de inflamação aguda e crônica e ativador de macrófagos M1 e encontra-se elevada em uma série de doenças inflamatórias como doença renal crônica, lúpus eritematoso sistêmico e Covid-19 (Seyhan *et. al.*, 2014; Ueda; Takasawa, 2018; Dahan *et. al.*, 2020; Plays; Müller; Rodriguez, 2021). Na AF, os níveis basais de ferritina sérica são normalmente elevados em relação a indivíduos saudáveis devido ao processo inflamatório instaurado, aumentando ainda mais durante as crises de vaso-oclusão agudas (Lee *et. al.*, 2022). Tal fato se deve à exposição de células mononucleadas ao ferro por meio da diminuição da vida média dos eritrócitos, da hemólise intravascular e por transfusões sanguíneas frequentes (van Beers *et. al.*, 2015).

Os níveis de proteína C reativa estiveram mais elevados em pacientes com AF em comparação com o grupo controle. Na AF, o dano endotelial e ativação de células endoteliais e de moléculas de adesão levam à inflamação, liberação de proteína C reativa e outros mediadores inflamatórios com subsequente aumento da isquemia (Okocha *et. al.*, 2014). A produção de proteína C reativa faz parte de uma resposta de fase aguda inespecífica à inflamação e necrose tecidual estando, portanto, elevadas normalmente em pacientes com AF em comparação a indivíduos saudáveis e aumentando ainda mais durante as crises de vaso-oclusão (Manwani; Frenette, 2013; Okocha *et. al.*, 2014; Lee *et. al.*, 2022).

No presente estudo não houve associação entre o polimorfismo de *IRF1* rs839 e os níveis de hemoglobina fetal. Níveis aumentados de hemoglobina fetal conferem melhor prognóstico e redução na gravidade da doença em pacientes com AF, visto que é responsável pela diminuição da polimerização de HbS, uma melhor oxigenação de tecidos e redução da inflamação (Mohammad *et. al.*, 2020). O gene *BCL11A* é um importante modulador da AF devido ao fato de codificar um fator de transcrição que modula a expressão do gene da γ -globina, essencial na síntese de HbF (Chaouch *et. al.*, 2016b). Dessa forma, alguns SNP nesse gene, como rs11886868 e rs4671393 são responsáveis por aumentar os níveis de HbF em pacientes com AF (Chaouch *et. al.*, 2016b). Além disso, Laurentino e colaboradores (2018) identificaram uma associação entre o polimorfismo rs7557939 e o aumento da produção de LDH e da concentração de metemoglobina, biomarcadores de hemólise, em pacientes com AF em uso de hidroxiureia.

A maioria dos pacientes com AF não apresentaram crises de vaso-oclusão graves e anemia grave, o que pode estar atribuído ao uso de hidroxiureia. Os efeitos benéficos da hidroxiureia na AF são decorrentes da elevação dos níveis séricos de hemoglobina fetal, o que diminui a concentração de HbS dentro da hemácia, reduz o processo de polimerização da Hb, impede a falcização e que os eventos de vaso-oclusão ocorram (Yahouédéhou *et. al.*, 2019). Além disso, a hidroxiureia aumenta os níveis de hemoglobina, melhorando o quadro anêmico dos pacientes e diminuindo a necessidade de transfusões de concentrados de hemácias (Mangla *et. al.*, 2022).

O rs839 corresponde a um SNP de *IRF1* no qual há a substituição de uma base nitrogenada C por T, tendo como consequência mais grave uma variante 3' UTR. No presente estudo a determinação da frequência alélica e distribuição genotípica do SNP de *IRF1* rs839 revelou a prevalência do alelo selvagem C e o genótipo CT em pacientes com AF e grupo controle, não havendo diferença entre os grupos. Ainda, a frequência do alelo polimorfo T determinada no estudo atual foi de 34,6% em pacientes com AF e 37,2% no grupo controle, valores inferiores aos relatados na literatura para a população geral, que é de 41% (The 1000 Genomes Project Consortium, 2015).

Modificações de um ou ambos os alelos de *IRF1* foram descritos em uma variedade de doenças e podem desempenhar funções essenciais no desenvolvimento de câncer (Eason; Shepherd; Blanck, 1998; Nozawa *et. al.*, 1998; Wang *et. al.*, 2016). Um estudo *in vitro* com linhagem de células de carcinoma pulmonar e de carcinoma de bexiga demonstrou que o SNP de *IRF1* rs121912469 (T→A) resulta na conversão de um resíduo de triptofano no códon 11 por arginina (W11R). Essa região é referente ao domínio DBD compartilhado pelos membros da família dos IRF e a substituição desses resíduos leva à supressão da atividade de ligação ao DNA e a atividade transcricional (Eason; Shepherd; Blanck, 1998). Wang e colaboradores (2016) demonstraram que o SNP de *IRF1* rs56288038 (G→C) é regulado por MiR-502-5p por meio da supressão da transcrição de *IRF1*, estando relacionado com o risco de desenvolvimento de câncer gástrico e diminuição da taxa de sobrevivência em pacientes com câncer gástrico após cirurgia. Ainda, Nozawa e colaboradores (1998) demonstraram que o SNP de *IRF1* rs127912470 (A→T) é responsável pela inativação do gene, diminuindo consideravelmente a atividade transcricional por meio da inibição da ligação ao DNA e aumentando o desenvolvimento de câncer gástrico.

Onnie e colaboradores (2006) demonstraram uma associação do SNP de *IRF1* rs11242115 (G→C) com a susceptibilidade à Doença de Chron. Entretanto, não foi possível estabelecer a funcionalidade do polimorfismo em relação à patogênese da doença. Vale

ressaltar que a região cromossômica avaliada no estudo acima foi a mesma do presente estudo e possui um *cluster* de genes de citocinas, fato esse que justifica a necessidade de estudos sobre esses polimorfismos de *IRF1* abrangendo doenças de caráter inflamatório.

A contagem de monócitos esteve diminuída significativamente no genótipo CC em relação ao CT em pacientes com AF que não faziam uso de hidroxiureia. O *IRF1* participa da diferenciação de monócitos por meio da indução de fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), o qual é regulado positivamente na inflamação (Battistini, 2009). Os monócitos podem influenciar eventos inflamatórios e, quando ativados, possuem capacidade de gerar NO. A baixa biodisponibilidade de NO na AF leva ao aumento de expressão de moléculas de adesão, culminando em estresse oxidativo, crises de vaso-oclusão e subsequente inflamação (Mitchell; Roediger; Weninger, 2014; Nader; Romana; Cones, 2020). Nesse contexto, polimorfismos no gene *IRF1* podem estar associados com a produção de monócitos e/ou sua ativação, estando relacionados com as complicações da doença.

A contagem de plaquetas foi reduzida significativamente no genótipo CC em comparação ao CT nos pacientes com AF que não faziam uso de hidroxiureia. Embora o número de plaquetas se mantenha normal na AF, durante a inflamação as plaquetas são ativadas e liberam multímeros de von Willebrand, tendo como consequências ligação ao endotélio e drepanócitos e consequente aumento das crises de vaso-oclusão (Sundd; Gladwin; Novelli, 2019).

No presente estudo não houve associação entre a frequência alélica ou a distribuição genotípica do polimorfismo em relação à ocorrência de crises-oclusivas graves. Belmont e colaboradores (2016) demonstraram associação entre o polimorfismo de *LGALS3* e os níveis séricos intermediários e baixos de GAL-3 com maiores frequências de crises de vaso-oclusão em pacientes com AF em estado basal. Embora não haja relatos avaliando as funções de SNP de *IRF1* na clínica da AF, ainda persiste a busca de novos marcadores genéticos que indiquem a predisposição de crises de vaso-oclusão nessa população.

O polimorfismo de *IRF1* rs839 não esteve associado com o grau de anemia nos pacientes com AF, o que pode estar relacionado com a baixa incidência de anemia grave e a prevalência do uso de hidroxiureia na população estudada. Diakite e colaboradores (2011) determinaram a associação do SNP de *IRF1* rs2706384 com resposta ao tratamento com pacientes portadores de malária, evidenciando que a presença de polimorfismos pode proporcionar vantagens no manejo de doenças.

Não houve associação entre histórico de STA e frequência alélica ou distribuição genotípica do polimorfismo de *IRF1* rs839. A determinação de fatores de risco para o

desenvolvimento de complicações clínicas auxilia na identificação precoce e permite atenção especial para a prevenção de resultados adversos. Alkindi e colaboradores (2020) demonstraram que pacientes com leucocitose juntamente com a diminuição dos níveis de Hb e trombocitose evoluíam mais frequentemente para STA quando comparados com pacientes com AF sem STA prévia. Em pacientes com AF em estado basal, observou-se uma associação entre polimorfismos relacionados ao perfil de baixa produção de IL-10 e a ocorrência prévia de STA. Além disso, foi identificado que pacientes com histórico de STA apresentaram níveis elevados de TNF- α em comparação aqueles sem STA prévio, indicando a persistência de um processo inflamatório crônico (Cavalcante *et. al.*, 2016).

O polimorfismo de *IRF1* rs839 não esteve associado com histórico de AVC em pacientes com AF, fato esse que pode ser atribuído à baixa prevalência da complicação no grupo estudado. Na AF, a ocorrência de AVC aumenta quando as crises de vaso-oclusão ocorrem especificamente na vasculatura cerebral, sendo mais frequentes na infância e início da fase adulta (Pinto *et. al.*, 2019; Edwards *et. al.*, 2022). Alguns polimorfismos foram avaliados na AF com o intuito de serem utilizados como preditores de risco ou proteção para o desenvolvimento de AVC. Pacientes com AF que exibiam genótipo GG para o polimorfismo de *IL6* rs1800795 tiveram cerca de três vezes menos chances de desenvolver AVC em relação aqueles com genótipo GC e CC (Domingos *et. al.* 2017). Ainda, em um estudo recente desenvolvido pelo nosso grupo de estudo foi verificado que um polimorfismo de *Irf4* na região rs1877176 esteve associado a um menor risco de desenvolvimento de AVC (Nojosa, 2023). Contrariamente, Barbosa e colaboradores (2014) verificaram associação entre polimorfismos na haptoglobina com risco de hospitalização ou sequela de AVC. Nesse contexto, investigações da influência de diferentes polimorfismos nas complicações clínicas na AF podem indicar novos moduladores genéticos da doença e propiciar abordagens inéditas para o tratamento.

Não houve associação entre úlceras de membros inferiores e frequência alélica ou distribuição genotípica do polimorfismo de *IRF1* rs839. Os SNP podem explicar diferenças individuais na gravidade de doenças, incluindo susceptibilidade às complicações clínicas. Nesse contexto, em um estudo desenvolvido em São Paulo com pacientes adultos com AF em estado basal, foi verificado que um polimorfismo de *IL6* esteve associado com o risco para o desenvolvimento de úlceras de membros inferiores (Vicari *et. al.*, 2015). Ainda, os autores identificaram que a baixa frequência do alelo recessivo dificulta a confirmação da influência genética nas características clínicas dos pacientes, fato que pode justificar os resultados encontrados no presente estudo.

O polimorfismo de *IRF1* rs839 não esteve associado com histórico de necrose avascular em pacientes com AF. A necrose avascular é uma condição causada pela redução do fluxo sanguíneo nos ossos, afetando principalmente articulações do fêmur, ombros, joelho e calcânhar (Leandro *et. al.*, 2022). Dentre os polimorfismos genéticos avaliados com potencial risco de desenvolvimento dessa condição na AF, destacam-se SNP em genes relacionados ao crescimento e diferenciação de condrócitos e osteoblastos (*BMP6*), ao controle de canais de íons e vias endócrinas de regulação da vitamina D e produção de óxido nítrico (*Klotho*) e à regulação de processos envolvidos na homeostase e mineralização óssea (*ANXA2*) (Baldwin *et. al.*, 2005; Pandey *et. al.*, 2012; Samara *et. al.*, 2013; Pacheco; Gonçalves, 2014; Chaouch *et. al.*, 2015).

Priapismo é uma condição considerada como emergência urológica, pois se não tratada imediatamente poderá levar à fibrose do pênis, disfunção erétil e impotência. Embora não tenha sido associado com a frequência alélica ou distribuição genotípica do polimorfismo de *IRF1* rs839, alguns estudos demonstram associações entre alguns marcadores genéticos na AF como fator XIII e TGF- β , relacionados com a biologia vascular endotelial (Elliot *et. al.*, 2007; Figueiredo *et. al.*, 2021).

Dentre as complicações hepatobiliares observadas, a colelitíase foi a mais frequente, tendo ocorrido previamente em 41,1% dos pacientes. A colelitíase é uma das complicações hepatobiliares mais comuns na AF e embora seja mais frequente em adolescentes e adultos, pacientes mais velhos possuem risco aumentado de formação de cálculos biliares (Pontes *et. al.*, 2017; Martins *et. al.*, 2017). Algumas variações genéticas são responsáveis pelo aumento de risco de colelitíase em pacientes com AF, como os polimorfismos rs887829 do gene *UGT1A1* e rs4149000 do gene *SLCO1A2*, cujas proteínas estão envolvidas no transporte de bilirrubina hepática (Chaouch *et. al.*, 2016a; Batista *et. al.*, 2021).

A colecistite é uma das complicações da colelitíase sintomática e ambas estão inclusas no grupo de doenças de cálculo biliar, juntamente com colangite e coledocolitíase (Pontes *et. al.*, 2017). As doenças de cálculo biliar são complexas e multifatoriais, dependendo de fatores ambientais e genéticos, este contribuindo em cerca de 20 a 40% para a sua patogênese (Banach *et. al.*, 2022). Nesse contexto, em um estudo envolvendo 900 pacientes com colecistite, Bonde e colaboradores (2020) identificaram SNP associados com o risco para colecistite em um locus na região cromossômica 5p15. Vale ressaltar ainda que a região estudada se situava próxima às regiões codificantes de *DNAH5* e *LOC105374660*, genes os quais são expressos na vesícula biliar. No presente estudo, houve maior incidência de

colecistite nos pacientes com genótipo TT do polimorfismo rs839 de *IRF1* em relação aos genótipos CC e CT. Esse achado pode estar relacionado com um possível aumento de expressão de citocinas pró-inflamatórias, as quais são responsáveis por desencadear as crises de vaso-oclusão com subsequente isquemia e inflamação, propiciando a ocorrência de colecistite. Entretanto, para determinar a influência do SNP rs839 no desenvolvimento de colecistite, são necessários estudos que avaliem uma maior quantidade de pacientes com a condição, além dos níveis de citocinas pró-inflamatórias reguladas pelo gene que sejam relevantes nos processos de crises de vaso-oclusão na AF.

O presente estudo possui algumas limitações como o tamanho reduzido da amostra, uso de hidroxiureia, baixa incidência das complicações clínicas e dependência da disponibilidade e qualidade de registros médicos. Entretanto, vale ressaltar que participaram do estudo todos os pacientes com anemia falciforme que compareceram ao centro de referência durante o período do estudo, de forma que compuseram uma amostra representativa. Ainda, os resultados obtidos nesse trabalho impulsionam novas pesquisas sobre as funções do polimorfismo de *IRF1* rs839 frente às complicações clínicas da AF, uma vez que os achados evidenciaram uma associação entre o alelo polimórfico com biomarcadores de mau prognóstico na doença. Portanto, baseando-se nos resultados obtidos, evidencia-se a necessidade de estudos longitudinais com um número maior de pacientes com a doença.

6 CONCLUSÃO

Os pacientes com AF eram em sua maioria do sexo feminino e tinham o IMC dentro da faixa normal. Os níveis de hemoglobina e razão de neutrófilos/linfócitos foram inferiores em relação ao grupo controle. Em contrapartida, o volume corpuscular médio e a contagem de leucócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas foram elevadas em comparação com o grupo controle. Com relação à clínica da doença, houve prevalência de crises de vaso-oclusão não graves, grau de anemia moderado e utilização de hidroxiureia por mais de 5 anos.

A determinação da frequência alélica e distribuição genotípica do polimorfismo de *IRF1* rs839 demonstrou prevalência do alelo selvagem C e genótipo CT nos pacientes com anemia falciforme e grupo controle, não havendo diferenças entre as populações com ou sem a doença.

Dentre os pacientes que não faziam uso de hidroxiureia, aqueles com genótipo CT e TT apresentaram contagens elevadas de monócitos e plaquetas em relação ao genótipo CC.

O polimorfismo de *IRF1* (rs839) não esteve associado com anemia grave, crises-oclusivas graves, síndrome torácica aguda, acidente vascular cerebral, úlceras de membros inferiores, necrose avascular, sequestro esplênico, esplenomegalia, hepatomegalia, nefropatia falciforme, doença cardíaca, priapismo e colelitíase. Entretanto, pacientes com genótipo TT apresentaram maior incidência de colecistite em relação aos genótipos CC e CT.

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, 2017.
- AFIFI, A. A. *et. al.* IL-1 β +3954 C/T polymorphism and its clinical associations in egyptian sickle cell disease patients. **International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research**. v.13, n.1, p. 35 – 41, 2019.
- ALAGBE, A. E.; OLANIYI, J. A. Pattern of neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ration in sickle cell anemia patients at steady state and vaso-occlusive crisis. **Journal of Applied Hematology**. v. 10, n. 2, p. 45 – 50, 2019.
- ALI, E. H. *et. al.* Nutritional and hematological status of Sudanese women of childbearing age with steady-state sickle cell anemia. **Oman Medical Journal** v. 36, n. 3, p. 514 – 519, 2021.
- ALKINDI, S. *et. al.* Predictors of impending acute chest syndrome in patients with sickle cell anemia. **Scientific Reports**. v.10, n. 1. doi.org/10.1038/s41598-020-59258-y, 2020.
- ALLALI, S. *et. al.* Chronic organ injuries in children with sickle cell disease. **Haematologica**. v. 106, n. 6, p. 1535 – 1544, 2021.
- ALVAIA, M. A. *et. al.* Prevalence of priapism in individuals with sickle cell disease and implications on male sexual function. **Einstein (São Paulo)**, v. 18, p. 1-1, 2020.
- ALZHRANI F. *et. al.* Risk factor and complications among pediatric patients with sickle cell anemia: a single tertiary center retrospective study. **Cureus**. v. 13, n. 1, 8 p., 2020.
- ATAGA, K. I. *et. al.* Crizanlizumab for the prevention of pain crises in sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.** v. 379, n. 1, p. 429 – 439, 2017.
- BALDWIN, C. *et. al.* Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. **Blood**. v. 106, n. 1, p. 372 – 375, 2005.
- BALASUBRAMANIAN, S.P. *et. al.* Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European Journal of Surgery Oncology**. v. 30, p. 593 – 601, 2004.
- BANACH, B. *et. al.* Association study of *SLCO1B3* and *ABCC3* Genetic variants in gallstone disease. **Genes**. v. 13, n. 3, doi: 10.3390/genes13030512, 2022.
- BARBOSA, L. C. P. *et. al.* Haptoglobin and myeloperoxidase (-G463A) gene polymorphisms in brazilian sickle cell patients with and without secondary iron overload. **Blood Cells, Molecules and Diseases**. v. 52, p. 95 – 107, 2014.
- BARONCIANI, D. *et. al.* Hemopoietic stem cell transplantation in thalassemia: a report from the European Society for Blood and Bone Marrow Transplantation Hemoglobinopathy Registry, 2000-2010. **Bone Marrow Transplant**. v. 51, n. 1, p. 536 -541, 2016.
- BATISTA, J. V. G. F. *et. al.* Influence of UGT1A1 promoter polymorphism, α -thalassemia and β^s haplotype in bilirubin levels and cholelithiasis in a large sickle cell anemia cohort. **Annals of Hematology**. v. 100, n. 1, p. 903 – 911, 2021.

- BATTISTINI, A. Interferon regulatory factors in hematopoietic cell differentiation and immune regulation. **Journal of Interferon and Cytokine Research**. v. 29, n. 12, p. 765 – 779, 2009.
- BELCHER, J. D. *et al.* Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 123, n. 3, p. 377-390, 2014. CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 29, n. 3, p. 203 – 206, 2007.
- BONDE, A. *et al.* Identification of a new genetic variant associated with cholecystitis: A multicenter genome-wide association study. **J. Trauma Acute Care Surg.** v. 89, n. 1, p. 173 – 178, 2020.
- CAVALCANTE, J. E. A. *et al.* Clinical events and their relation to the tumor necrosis factor- α and interleukin-10 genotypes in sickle cell anemia patients. **Hemato. Oncol. Stem Cell. Ther.** v. 9, p. 14 – 19, 2016.
- CHAOUCH, L. *et al.* Association between rs267196 and rs267201 of BMP6 gene and osteonecrosis among sickle cell anemia patients. **Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech Repub.** <http://doi.org/10.5507/bp.2013.080>, 2015.
- CHAOUCH, L. *et al.* Genetic link with cholelithiasis among pediatric SCA Tunisian patients: Examples of *UGT1A1*, *SLCO1A2* and *SLCO1B1*. **Hematology**. v. 21, n. 2, p. 121 – 125, 2016a.
- CHAOUCH, L. *et al.* rs11886868 and rs4671393 of BCL11A associated with HbF level variation and modulate clinical events among sickle cell anemia patients. **Hematology**. v. 1, n. 5, DOI: 10.1179/1607845415Y.0000000026, 2016b.
- CHEN, Grace Y.; NUÑEZ, Gabriel. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826-837, 2010.
- CHEN, G. *et al.* Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. **Blood**. v. 123, n. 24, p. 3818 – 3827, 2014.
- CHISTIYAKOV, D. A. *et al.* The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2. **Immunobiology**. v. 223, p. 101 – 111, 2018.
- COLOMBATTI, R.; BIRKEGÅRD, C.; MEDICI, M. PB2215: global epidemiology of sickle cell disease: a systematic literature review. **Hemasphere**, v. 6, p. 2085 - 2086, 2022.
- COSTA, F.F.; CONRAN, N.; FERTRIN, K.Y. Anemia Falciforme. *In*: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 205 – 223.
- DA CRUZ, S. V. *et al.* Avaliação da qualidade de vida em pacientes adultos com anemia falciforme no norte de Minas Gerais – Brasil. **Rev. Med. Minas Gerais**. v. 26, p. 23 – 30, 2016.
- DAHAN, S. *et al.* Ferritin as a Marker of Severity in COVID-19 Patients: A Fatal Correlation. **Isr. Med. Assoc. J.** v. 22, n. 8, p. 429 – 434, 2020.

DALTRO, P. B. CD4+ T Cell Profile and Activation Response in Sickle Cell Disease Patients with Osteonecrosis. **Mediators Of Inflammation**, v. 2020, p. 1-12, 2020.

DARBARI, D. S.; SHEEHAN, V. A.; BALLAS, S. K. The vaso-occlusive pain crisis in sickle cell disease: Definition, pathophysiology, and management. **Eur. J. Haematol.** v. 125, p. 237 – 246, 2020.

DESAI, A. A.; MACHADO, R. F.; COHEN, R. T. The cardiopulmonary complications of sickle cell disease. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.** v. 36, n.6, p. 1217 – 1237, 2022.

DIAKITE, M. *et. al.* Host candidate gene polymorphisms and clearance of drug-resistant *Plasmodium falciparum* parasites. **Malaria Journal.** v. 10, n. 250, 13 p., 2011.

DIKMEN, N. Polisomographic investigation of sleep disorders in patients with sickle cell anemia and evaluation of the effect on the prognosis. **Turk Thorac J.** v. 23, n. 3, p. 218 – 224, 2022.

DING, S. *et. al.* Tagging Single Nucleotide Polymorphisms in the *IRF1* and *IRF8* Genes and Tuberculosis Susceptibility. **Plos One.** v. 7, n. 8, doi:10.1371/journal.pone.0042104, 2012.

DOMINGOS, I. F. *et. al.* Interleukin-6 G-174-C polymorphism predicts higher risk of stroke in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology.** v. 182, p. 276 – 307, 2017.

DONG, M.; MCGANN, P. T. Changing the Clinical Paradigm of Hydroxyurea Treatment for Sickle Cell Anemia Through Precision Medicine. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 109, n. 1, p. 73 – 81, 2021.

DOS SANTOS, M. P. *et. al.* Perfil epidemiológico de casos notificados da doença falciforme no Ceará. **Brazilian Journal of Development.** v. 7, n. 1, p. 6480 – 6852, 2021.

EASON, D. D.; SHEPHERD, A. T.; BLANCK, G. Interferon regulatory factor 1 tryptophan 11 to arginine point mutation abolishes DNA binding. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1446, p. 140-144, 1999.

EATON, W.A.; HOFRICHTER, J. Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. **Blood.** v. 70, p. 1245 – 1266, 1987.

EDAWRDS, O. *et. al.* Influence of Haptoglobin Polymorphism on Stroke in Sickle Cell Disease Patients. **Genes.** v. 13, n. 144, DOI: 10.3390/genes13010144, 2022.

ELFORD, H. L. Effect of hydroxyurea on ribonucleotide reductase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 33, p. 129 – 135, 1968.

ELIAS, D.B.D. *et al.* Correlation of low levels of nitrite and high levels of fetal hemoglobin in patients with sickle cell disease at baseline. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 24, n.4, p. 265 – 269, 2012.

ELLIOTT, L. *et. al.* Genetic polymorphisms associated with priapism in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.** v. 137, p. 262 – 267, 2007.

ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. **Nature medicine,** v. 17, n. 11, p. 1391-1401, 2011.

- EMOKPAE, M.; ABDU, A.; GWARAM, B. Neutrophil-to-lymphocyte, platelet-to-lymphocyte ratios and their association with atherogenic index of plasma in sickle cell nephropathy. **J. Appl. Hematol.** v. 7, p. 24 – 29, 2016.
- EZENWA, M. O. *et al.* Outpatient pain predicts subsequent one-year acute health Care Utilization Among Adults with Sickle Cell Disease. **J. Pain. Symptom Manage.** v. 48, n. 1, p. 65 – 74, 2014.
- FIGUEIREDO, C. V. B. *et al.* Priapism in sickle cell disease: Associations between *NOS3* and *EDNI* genetic polymorphism and laboratory biomarkers. **Plos One.** v. 16, n. 2, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246067>, 2021.
- FRANGOUL, H. *et al.* CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. **N. Engl. J. Med.** v. 384, n. 3, 9 pp. 2020.
- GIEGER, C. *et al.* New genes function in megakaryopoiesis and platelet formation. **Nature.** v. 480, n. 7376, p. 201 – 208, 2012.
- GILLI, S. C. O. *et al.* Cytokine polymorphisms in sickle cell disease and the relationship with cytokine expression. **Experimental Hematology.** v. 44, p. 583 – 589, 2016.
- GLADWIN, M. T.; OFORI-ACQUAH, S. F. Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology,** v. 123, n. 24, p. 3689-3690, 2014.
- GRANJA, P. D. *et al.* Úlceras de perna em pacientes com anemia falciforme. **Jornal Vascular Brasileiro.** v. 19, 8 p. 2020.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Características étnico-raciais da população: classificações e identidades. Fortaleza, CE: IBGE, 2022.
- KATO, J. G. *et al.* Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers.** v. 4, n. 18010, p. 1 – 22, 2018.
- KAUL, D.K.; HEBBEL, R. P. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. **J. Clin. Invest.** v. 106, p. 411 – 420, 2000.
- KIM, M. *et al.* Hypoxia enhanced adhesion of red blood cells n microscale flow. **Microcirculation.** v. 24, n. 5, 26 p., 2017.
- LAHOZ, J. A. *et al.* Parvovirus b19 infection in children with sickle cell disease, watch out for splenomegaly! A case report. **African Health Sciences.** v. 22, n. 1, p. 598-601, 2022.
- LAMARRE, Y. *et al.* Male gender, increased blood viscosity, body mass index and triglyceride levels are independently associated with systematic relative hypertension in sickle cell anemia. **Plos One.** v. 8, n. 6, 6 p., 2013.
- LAURENTINO, M. R. *et al.* Analysis of BCL11A gene polymorphisms and hemolysis parameters in patients with sickle-cell disease. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 54, n. 3, p. 132 – 137, 2018.

- LEANDRO, M. P. *et al.* Polymorphisms and avascular necrosis in patients with sickle cell disease – A systematic review. **Rev. Paul. Pediatric.** doi: 10.1590/1984-0462/2022/40/2021013IN. 2022.
- LEE, J. X. *et al.* Role of Serum Ferritin in Predicting Outcomes of COVID-19 Infection Among Sickle Cell Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Front. Med.** v. 9, n. 919159, doi: 10.3389/fmed.2022.919159, 2022.
- LIN, Y., HE, Y. The ontology of genetic susceptibility factors (OGSF) and its application in modeling genetic susceptibility to vaccine adverse events. **Journal of Biomedical Semantics.** v. 5, n. 19, doi: 10.1186/2041-1480-5-19, 2014.
- LU, M. *et al.* Blood rheology biomarkers in sickle cell disease. **Experimental Biology and Medicine.** v. 245, p. 155 – 165, 2020.
- MA, Y. *et al.* Genetic predisposition to adverse events in Chinese children aged 3-24 months after diphtheria, tetanus, acellular pertussis and haemophilus influenzae type b combined vaccination. **Expert Rev. Vaccines.** v. 21, n. 12, p. 1923 – 1928, 2022.
- MAHARAJ, S.; CHANG, S. Clinical Utility of Neutrophil to Lymphocyte Ratio in Sickle Cell Disease with Vaso-Occlusive Crisis. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy.** v. 15, p. 79 – 82, 2023.
- MAIA FILHO, P. A. *et al.* Is Chronic Use of Hydroxyurea Safe for Patients with Sickle Cell Anemia? An Account of Genotoxicity and Mutagenicity. **Environmental and Molecular Mutagenesis.** DOI: 10.1002/em.22260, 2018.
- MANGLA, A. *et al.* Sickle Cell Anemia. In: **StatPearls.** Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482164>, 2022.
- MANWANI, D.; FRENETTE, P. S. Vaso-occlusion in sickle cell disease: Pathophysiology and novel targeted therapies. **Blood.** doi: 10.1182/asheducation-2013.1.362, 2013.
- MARTIN, F. J. *et al.* Ensembl 2023. **Nucleic Acids Research.** v. 51, p. 933 – 941, 2023.
- MARTINS, R. A. *et al.* Cholelithiasis and its complications in sickle cell disease in a university hospital. **Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy.** v. 39, n. 1, p. 28 – 31, 2017.
- MBURU, J.; ODAME, I. Sickle cell disease: reducing the global disease burden. **Int. J. Lab. Hematol.** v. 41, p. 82 – 88, 2019.
- 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.
- MITCHELL, A. J.; ROEDIGER, B.; WENINGER, W. Monocyte homeostasis and the plasticity of inflammatory monocytes. **Cellular Immunology.** v. 291, p. 22 – 31, 2014.
- MOHAMMAD, S. N. N. A. *et al.* Single Nucleotide Polymorphisms in XMN1-HBG2, HBS1L-MYB, and BCL11A and Their Relation to High Fetal Hemoglobin Levels That Alleviate Anemia. **Diagnostics.** v. 1, n. 1374, DOI: 10.3390/diagnostics12061374, 2020.

MURAO, M.; FERRAZ, M.H.C. Traço falciforme: heterozigose para hemoglobina S. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 134, n. 4, p. 223 – 225, 2007.

NADER, E.; ROMANA, M.; CONNES, P. The red blood cell – Inflammation vicious circle in sickle cell disease. **Frontiers in Immunology.** v. 11, n. 454, DOI: 10.3389/fimmu.2020.00454, 2020.

NOJOZA, A. K. B. **Investigação da influência do polimorfismo do fator regulador de interferon 4 com as complicações clínicas e com o perfil sérico do interferon gama em pacientes com anemia falciforme.** 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Fisioterapia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

NOZAWA, H. *et. al.* Functionally inactivating point mutation in the tumor-suppressor IRF-1 gene identified in human gastric cancer. **Int. J. Cancer.** v. 77, p. 522-527, 1998.

NTUNZWENIMANA, J. C. *et. al.* Functional screen of inflammatory bowel disease genes reveals key epithelial functions. **Genome Medicine.** DOI: <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00996-7>, 2021.

ODENTUNDE, O. I. *et. al.* Body Mass Index and other anthropometric variables in children with sickle cell anaemia. **Pak. J. Med. Sci.** v. 32, n. 2, p. 341 – 346, 2016.

OFORI-ACQUAH, S. Sickle cell disease as a vascular disorder. **Expert Review of Hematology.** DOI: 10.1080/17474086.2020.1758555, 2020.

OKOCHA, C. E. *et. al.* C-reactive Protein and Disease Outcome in Nigerian Sickle Cell Disease Patients. **Annals of Medical and Health Science.** v. 4, n. 5, p. 701 – 705, 2014.

ONIMOE, G.; ROTZ, S. Sickle cell disease: a primary care update. **Cleveland Clinical Journal of Medicine.** v. 87, n.1, p. 19 – 27, 2020.

ONNIE, C. *et. al.* Sequence variation, linkage disequilibrium and association with Chron's disease on chromosome 5q31. **Genes and Immunity.** v. 7, p. 359-365, 2006.

PACHECO, A. P. S.; GONÇALVES, M. Klotho: Its various functions and association with sickle cell disease subphenotypes. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 36, n. 6, p. 430 – 436, 2014.

PANDEY, S. *et. al.* Effect of ANXA2 gene single nucleotide polymorphism (SNP) on the development of osteonecrosis in indian sickle cell patients: as pcr rflp approach. **Indian J. Exp. Biol.** v. 50, n. 7, p. 455 – 458, 2012.

PIEL, F. B. *et. al.* Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. **Lancet.** v. 381, n. 1, p. 142 – 151, 2013.

PINTO, V. M. *et. al.* Sickle cell disease: a review for the internist. **Internal and Emergency Medicine.** v. 14, n. 1, p. 1051 – 1064, 2019.

PLAYS, M.; MÜLLER, S.; RODRIGUEZ, R. Chemistry and Biology of ferritin. **Metallomics.** v. 13, n. 5, doi: 10.1093/mtomcs/mfab021, 2021.

- PONTES, R. M. *et al.* Protector effect of α -thalassaemia on cholecystitis and cholecystectomy in sickle cell disease. **Hematology**. v. 22, n. 7, p. 444 – 449, 2017.
- REDDING-LALLINGER, R.; KNOLL, C. Sickle cell disease – pathophysiology and treatment. **Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care**. v. 36, n. 10, p. 346 – 376, 2006.
- REIF, D. M. *et al.* Genetic basis for adverse events in smallpox vaccination. **The Journal of Infection Diseases**. v. 198, p. 16-22, 2008.
- RESS, D.C.; GIBSON, J.S. Biomarkers in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 156, p. 433-445, Nov 2011.
- RUIZ, M. A. *et al.* Thrombomodulin and Multi-Organ Failure in Sickle Cell Anemia. **Am. J. Hematol.** v. 97, n. 3, p. 102 – 105, 2022.
- SALEM, S.; SALEM, D.; GROS, P. Role of IRF8 in immune cells functions, protection against infections, and susceptibility to inflammatory diseases. **Human Genetics**. v. 139. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02154-2>. 2020.
- SAMARA, S. *et al.* Bone morphogenetic proteins (BMPs) expression in the femoral heads of patients with avascular necrosis. **Mol. Biol. Rep.** v. 40, n. 7, doi: 10.1007/s11033-013-2538-y. 2013.
- SANTOS, F.A.B.; LEMES, R.B.; OTTO, P.A. HW_TEST, a program for comprehensive HARDY-WEINBERG equilibrium testing. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 2, p. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0380>
- SEBASTIANI, P. *et al.* Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. **Nat. Genet.** v. 37, p. 435- 440, 2005.
- SERJEANT, G. R.; VICHINSKY, E. Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. **Blood Cells, Molecules and Diseases**. v. 70, p. 66 – 77, 2018.
- SEYHAN, S. *et al.* The correlation between ferritin level and acute phase parameters in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Eur. J. Rheumatol.** v. 1, n. 3, p. 92 – 95, 2014.
- SHI L. *et al.* Genome-wide analysis of interferon regulatory factor I binding in primary human monocytes. **Gene**. v. 487, p. 21 – 28, 2011.
- SPIRA, J. A. O. *et al.* Prevalence of people with sickle cell disease and leg ulcers in Brazil: Socioeconomic and clinical overview. **Plos One**. v. 17, n. 9, DOI: 10.1371/journal.pone.0274254, 2022.
- STEINBERG, M. H. *et al.* The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: A 17.5year follow-up. **Am J Hematol.** v. 85, n. 6, p. 403 – 408. 2010.
- STEINBERG, M. H. Fetal hemoglobin in sickle cell disease. **Blood**. v. 136, n. 21, p. 2392 – 2400. 2020.

STEINBERG, M.H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **The Scientific World Journal**. v. 9. DOI: 10.1100/tws.2009.10. 2009.

STEVENS, A. G. *et. al.* National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. **Population Health Metrics**. v. 10, n. 22, 16 p., 2012.

SUDDLE, A. R. Management of liver complications in sickle cell disease. **Hematology**. v. 2019, n. 1, p. 345-350, 2019.

SUNDARARAJ, S.; CASAROTTO, M. G. Molecular interactions of IRF4 in B cell development and malignancies. **Biophysical Reviews**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00825-6> , 2021.

SUNDD, P.; GLADWIN, M.T.; NOVELLI, E.M. Pathophysiology of sickle cell disease. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v.14, p. 263-292, 2018.

TANABE, P. *et. al.* Understanding the complications of sickle cell disease. **Am. J. Nurs**. v. 119, n. 6, p. 26 – 35, 2019.

TANIGUCHI, T. *et. al.* IRF family of transcription factors as regulators of host defense. **Annu. Rev. Immunol**. v. 19, p. 623 – 655, 2001.

THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. A global reference for human genetic variation. **Nature**. v. 526, DOI: 10.1038/nature15393, 2015.

TOLEDO, S. L. O. *et. al.* Sickle cell disease: Hemostatic and inflammatory changes, and their interrelation. **Clinica Chimica Acta**. v. 493, p. 129 – 137, 2019.

TORRES, L. S. *et. al.* Frequencies of –308G/A (TNFA) and –509C/T (TGFB1) polymorphisms in sickle cell anemia patients from Brazil. **Genet. Mol. Res**. v. 12, p. 6762 – 6766, 2013.

UEDA, N.; TAKASAWA, K. Impact of Inflammation on Ferritin, Hepcidin and the Management of Iron Deficiency Anemia in Chronic Kidney Disease. **Nutrients**. v. 10, n. 9, doi: 10.3390/nu10091173, 2018.

VAN BEERS, E. J. *et. al.* Iron, Inflammation, and Early Death in Adults with Sickle Cell Disease. **Circ. Res**. v. 116, n. 2, p. 298 – 306, 2015.

VICARI, P. *et. al.* Interleukin-1 β and interleukin-6 gene polymorphisms are associated with manifestations of sickle cell anemia. **Blood Cell, Molecules and Diseases**. v. 54, p. 244 – 249, 2015.

WALTER, K. Acute Cholecystitis. **JAMA Network**. v. 327, n. 15, doi:10.1001/jama.2022.2969, 2022.

WANG, B. *et. al.* Rs56288038 (C/G) in 3'UTR of IRF-1 Regulated by MiR-502-5p Promotes gastric cancer development. **Cell. Physiology and Biochemistry**. v. 40, p. 391 - 399, 2016.

WASSEL, C. L. *et. al.* Association of genomic loci from a cardiovascular gene SNP array with fibrinogen levels in European American and African-Americans from six cohort studies: the Candidate Gene Association Resource (CARE). **Blood**. v. 117, n. 1, p. 268 - 275, 2011.

WHITAKER, A., OVSYANNIKOVA, I. G., POLAND, G. A. Adversomics: a new paradigm for vaccine safety and design. **Expert Rev. Vaccines**. v. 14, n. 7, p. 935 – 947, 2015.

WILFINGER, W. W., MACHKEY, M., CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. **Biotechniques**. v. 22, n.3, p. 478 - 481, 1997.

WILLMAN, C.L. *et. al.* Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia. **Science**. v. 259, p. 968 – 971, 1993.

YAHOUÉDÉHO, S. C. M. A. *et. al.* Hydroxyurea alters hematological, biochemical and inflammatory biomarkers in Brazilian children with SCA: investigating associations with β s haplotype and α -thalassemia. **Plos One**, v. 14, n. 7. DOI: 10.1371/journal.pone.0218040, 2019.

ZAGO, M.A.; PINTO, A.N.S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Ver. Bras. Hematol. Hemoter**, v.29, n.3, p. 207-214, 2007.

ZAHOREC, R. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, past, present and future perspectives. **Bratisl. Med. J.** v. 122, n. 7, p. 474 – 488, 2021.

ZAHRAN, M. A. *et. al.* Effect of Hydroxyurea Treatment on the Inflammatory Markers Among Children With Sickle Cell Disease. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**. v. 26, p. 1 – 7, 2020.

ZANETTE, D. L. *et. al.* Differential gene expression analysis of sickle cell anemia in steady state and crisis state. **Ann. Hum. Genetics**. v. 83, n. 5, p. 310 – 317, 2018.

ZENKE, K.; MUROI, M.; TANAMOTO, K. *IRF1* supports DNA binding of STAT1 by promoting its phosphorylation. **Immunology and Cell Biology**. v. 96, p. 1095 – 1103, 2018.

ZHANG, D. *et. al.* Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways ate the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood**. v. 127, n. 7, p. 801 – 811, 2016.

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.

_____ Data: / /

Assinatura do paciente/ representante legal

_____ Data: / /

Assinatura do responsável pelo estudo

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO 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 -80°C 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-oclusão 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 ç Rodolfo Teófilo ç Corredor 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), IFF-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 ζ Rodolfo Teófilo ζ 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

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_E1.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_Controlo.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 ζ Rodolfo Teófilo ζ Corredor 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

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 ζ Rodolfo Teófilo ζ 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