



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

**MARIA JANAÍNA PAULA GOMES**

**INTERLEUCINA 18: INFLUÊNCIA SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E  
NÍVEIS DE HEMOGLOBINA FETAL EM PACIENTES COM ANEMIA  
FALCIFORME ATENDIDOS NO HEMOCENTRO DE FORTALEZA-CE**

**FORTALEZA**  
**2025**

MARIA JANAÍNA PAULA GOMES

INTERLEUCINA 18: INFLUÊNCIA SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E  
NÍVEIS DE HEMOGLOBINA FETAL EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME  
ATENDIDOS NO HEMOCENTRO DE FORTALEZA-CE

Tese apresentada à Coordenação do  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Universidade Federal do  
Ceará, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutora em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientadora: Romélia Pinheiro Gonçalves  
Lemes

Coorientador: Tiago Lima Sampaio

FORTALEZA

2025

MARIA JANAÍNA PAULA GOMES

INTERLEUCINA 18: INFLUÊNCIA SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E  
NÍVEIS DE HEMOGLOBINA FETAL EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME  
ATENDIDOS NO HEMOCENTRO DE FORTALEZA-CE

Tese apresentada à Coordenação do  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Universidade Federal do  
Ceará, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutora em Ciências  
Farmacêuticas.

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

---

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

---

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio (Coorientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

Profa. Dra. Nina Bezerra de Moraes  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Profa. Dra. Maritza Cavalcante Barbosa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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)

---

- G615i Gomes, Maria Janaina Paula Gomes.  
Interleucina 18: influência sobre parâmetros hematológicos e níveis de hemoglobina fetal em pacientes com anemia falciforme atendidos no hemocentro de Fortaleza-CE / Maria Janaina Paula Gomes Gomes. – 2025.  
87 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2025.  
Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.  
Coorientação: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio .
1. Citocinas pró-inflamatórias. 2. Hidroxiureia. 3. Índices hematológicos. I. Título.

CDD 615

---

*Aos meus pais, Goretti e Olavo.*

## AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes**, pela orientação do trabalho de pesquisa e pela atenção dedicada durante todo esse tempo.

Ao **Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio**, por todo o ensinamento, paciência, experiências compartilhadas, dedicação, momentos de descontração e excelência profissional.

Aos professores da banca, **Profa. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite**, **Profa. Dra. Renata de Sousa Alves**, **Profa. Dra. Nina Bezerra de Moraes** e **Profa. Dra. Maritza Cavalcante Barbosa** pelo tempo disponibilizado para avaliação do trabalho, bem como pelas sugestões para engrandecimento do mesmo.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará, **Prof. Dr. Ramon Roseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes**.

À **Universidade Federal do Ceará** e a todos os professores que fizeram parte dessa longa jornada até chegar aqui, por todos os ensinamentos e contribuições.

Aos meus pais, **Goretti** e **Olavo** e aos meus avós, **Antônia Maria**, **Antônio Vicente** e **Dalila**, bases da minha família. Obrigada por todo apoio, compreensão e amor durante todos os dias fáceis e difíceis das nossas vidas.

Aos meus irmãos, **Jaqueline**, **Jackson**, **Janderson**, **Jardel** e **Jonas**, por todo o suporte e apoio que me deram durante todos esses anos.

Ao **Robson Couto**, que acompanhou de perto toda essa trajetória. Obrigada por todo o apoio prestado de maneira incansável durante a execução deste trabalho e por todo o amor, dedicação e cuidado que teve comigo.

Ao meu colega de turma e grande amigo, **Lucas Diogo**, que, desde a faculdade, me acompanha na vida acadêmica e pessoal.

À **Bianca Silva** e **Thais Portela** amigas que me ajudaram, me tranquilizaram e me apoiaram durante esse período.

Ao **Prof. Dr. Igor Iuco**, meu orientador de mestrado, que me incentivou lá no começo para eu ingressar no Doutorado.

***"A persistência é o caminho do êxito"***

*Charles Chaplin*

## RESUMO

O processo fisiopatológico da Anemia Falciforme (AF) está associado a fenômenos inflamatórios que resultam em crises vaso-oclusivas. Conseqüentemente, diversas citocinas são secretadas, incluindo a interleucina 18 (IL-18), que é capaz de estimular a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ). O objetivo do trabalho foi avaliar a influência da IL-18 e IFN- $\gamma$  em parâmetros hematológicos e nos níveis de Hemoglobina Fetal (HbF) em pacientes com AF atendidos em um hemocentro na cidade de Fortaleza, CE. O estudo foi do tipo transversal, observacional, descritivo e analítico. A pesquisa foi realizada no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) e analisada no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) do Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará (UFC). Um total de 116 voluntários de ambos os sexos participaram do estudo, sendo 85 com AF em estado estacionário, dos quais 73 eram tratados com Hidroxiuréia (HU) e 12 não faziam tratamento com o medicamento; além de 31 voluntários compondo o Grupo Controle. Foram coletadas amostras de sangue para a análise das citocinas IL-18 e IFN- $\gamma$  e os dados demográficos e laboratoriais foram obtidos de prontuários, no período entre julho de 2021 e maio de 2022. As variáveis hematológicas leucócitos, hemácias, hemoglobina, plaquetas e índices hematimétricos apresentaram diferenças significativas entre os pacientes do grupo AF quando comparadas com os participantes do grupo controle. A hemoglobina fetal (HbF) mostrou correlação negativa com leucócitos ( $\rho=-0,489$ ), neutrófilos ( $\rho=-0,483$ ), plaquetas ( $\rho=-0,282$ ) e reticulócitos ( $\rho=-0,325$ ) e correlação positiva com hemoglobina ( $\rho=0,350$ ). IL-18 e IFN- $\gamma$  estavam mais altos no grupo AF ( $p<0,001$ ) e não apresentaram diferença entre os usuários ou não de HU. Houve correlação entre IL-18 com leucócitos ( $\rho=0,260$ ), neutrófilos ( $\rho=0,260$ ), HbS ( $\rho=0,327$ ) e HbF ( $\rho=-0,244$ ) dos participantes com AF. Nos grupo de pacientes que fazem uso de HU, houveram associação de IL-18 com HbS ( $\rho=0,369$ ) e HbF ( $\rho=-0,246$ ), e ainda, correlação da IFN- $\gamma$  com os reticulócitos ( $\rho=-0,281$ ). Conclui-se que houve associação entre elevação da IL-18 e os parâmetros hematológicos, com aumento de leucócitos, neutrófilos e HbS. De forma contrária, foi vista uma correlação negativa entre o aumento da interleucina com a HbF e não foram relacionadas associações dos parâmetros com as elevações do IFN- $\gamma$ .

**Palavras-chave:** Citocinas pró-inflamatórias, Hidroxiureia, Índices Hematológicos.

## ABSTRACT

The pathophysiological process of Sickle Cell Anemia (SCA) is associated with inflammatory phenomena that lead to vaso-occlusive crises. Consequently, several cytokines are secreted, including interleukin-18 (IL-18), which can stimulate the production of interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ). The objective of this study was to evaluate the influence of IL-18 and IFN- $\gamma$  on hematological parameters and fetal hemoglobin (HbF) levels in patients with SCA treated at a blood center in Fortaleza, Ceará, Brazil. This was a cross-sectional, observational, descriptive, and analytical study. The research was conducted at the Ceará Hematology and Hemotherapy Center (HEMOCE) and analyzed at the Laboratory of Clinical and Toxicological Analyses (LACT) of the Department of Clinical and Toxicological Analysis at the Federal University of Ceará (UFC). A total of 116 volunteers of both sexes participated in the study, including 85 individuals with Sickle Cell Anemia (SCA) in a steady state, of whom 73 were undergoing treatment with Hydroxyurea (HU) and 12 were not receiving the medication. Additionally, 31 volunteers comprised the Control Group. Blood samples were collected for the analysis of IL-18 and IFN- $\gamma$  cytokines, and demographic and laboratory data were obtained from medical records between July 2021 and May 2022. The hematological variables—leukocytes, erythrocytes, hemoglobin, platelets, and red cell indices—showed significant differences between the sickle cell anemia (SCA) group and the control group. Fetal hemoglobin (HbF) exhibited a negative correlation with leukocytes ( $\rho = -0.489$ ), neutrophils ( $\rho = -0.483$ ), platelets ( $\rho = -0.282$ ), and reticulocytes ( $\rho = -0.325$ ), and a positive correlation with hemoglobin levels ( $\rho = 0.350$ ). IL-18 and IFN- $\gamma$  levels were significantly higher in the SCA group ( $p < 0.001$ ) and did not differ between hydroxyurea (HU) users and non-users. In SCA patients, IL-18 correlated with leukocytes ( $\rho = 0.260$ ), neutrophils ( $\rho = 0.260$ ), HbS ( $\rho = 0.327$ ), and HbF ( $\rho = -0.244$ ). Among HU users, IL-18 was associated with HbS ( $\rho = 0.369$ ) and HbF ( $\rho = -0.246$ ), and IFN- $\gamma$  showed a negative correlation with reticulocyte counts ( $\rho = -0.281$ ). It was concluded that increased IL-18 levels were associated with hematological parameters, including elevated leukocyte, neutrophil, and HbS levels. Conversely, a negative correlation was observed between IL-18 levels and HbF. No associations were found between the analyzed parameters and increased IFN- $\gamma$  levels.

**Key words:** Pro-inflammatory cytokine. Hydroxyurea. Red blood cells indices.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Fisiopatologia de pacientes com síndromes de talassemia .....	20
<b>Figura 2</b>	Esfregaço sanguíneo de células falciformes .....	21
<b>Figura 3</b>	Substituição do ácido glutâmico por um resíduo de valina na posição 6 na cadeia polipeptídica da $\beta$ -globina caracterizando a hemoglobina anormal (HbS). Essa alteração resulta de uma mutação causada por um unico nucleotídeo no gene HBB, responsável pela codificação da $\beta$ -globina.....	22
<b>Figura 4</b>	Distribuição de malária <i>versus</i> anemia falciforme no continente africano .....	23
<b>Figura 5</b>	Incidência do número de recém-nascidos com doença falciforme em 2021.....	24
<b>Figura 6</b>	Fisiopatologia da anemia falciforme .....	29
<b>Figura 7</b>	Regulação gênica da globina $\beta$ -like humana .....	34
<b>Figura 8</b>	Como a hemoglobina fetal inibe o processo de mudança na forma dos eritrócitos .....	35
<b>Figura 9</b>	Efeitos da hidroxiureia na anemia falciforme .....	37
<b>Figura 10</b>	Ligação da Interleucina 18 (IL-18) .....	40
<b>Figura 11</b>	Desenho esquemático do delineamento do estudo .....	53
<b>Figura 12</b>	Correlação entre os níveis de HbF com os leucócitos (A), neutrófilos (B), hemoglobina (C), plaquetas (D) e reticulócitos (E)	59
<b>Figura 13</b>	Mediana de IL-18 (a) e INF- $\gamma$ (b) dos pacientes <i>versus</i> controle.....	61
<b>Figura 14</b>	Gráficos com as correlações entre a IL-18 com leucócitos (A), neutrófilos (B), HbS (C) e HbF (D), do grupo AF .....	64
<b>Figura 15</b>	Gráficos com as correlações entre a IL-18 com a HbS (A) e HbF (B); e entre o INF- $\gamma$ com os reticulócitos (C) em dados de pacientes com anemia falciforme que utilizam a hidroxiureia.....	65
<b>Figura 16</b>	Gráficos com as correlações entre a IL-18 com leucócitos (A) e neutrófilos (B) em dados de pacientes com anemia falciforme que não utilizam a hidroxiureia .....	65

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Técnicas atuais para a detecção da anemia falciforme .....	32
<b>Quadro 2</b>	Relação do aumento da Interleucina 18 (IL-18) no desenvolvimento de cardiomiopatias na doença falciforme (DF) ..	41
<b>Quadro 3</b>	Coleta de dados dos prontuários dos pacientes com AF.....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Dados demográficos dos participantes do estudo .....	54
<b>Tabela 2</b>	Frequência de crises de dor em pacientes com anemia falciforme	55
<b>Tabela 3</b>	Avaliação dos parâmetros laboratoriais entre os grupo teste (com anemia falciforme) e o grupo controle .....	56
<b>Tabela 4</b>	Avaliação de parâmetros laboratoriais de acordo com o uso de Hidroxiuréia .....	57
<b>Tabela 5</b>	Correlação da HbF entre os pacientes com AF em uso de HU e a correlação entre a HbF entre os pacientes com AF que não seguem a terapia com HU .....	58
<b>Tabela 6</b>	Relação dos níveis de INF- $\gamma$ e IL-18 entre os grupos teste (com anemia falciforme), em uso ou não da terapia com hidroxiureia e grupo controle .....	60
<b>Tabela 7</b>	Correlação entre os níveis de IL-18 e INF- $\gamma$ com dados de exames laboratoriais dos participantes do estudo .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia falciforme
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CVO	Crise vaso-oclusiva
DAMPS	Padrões Moleculares Associados a Danos
DF	Doença Falciforme
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
eNOS	NO-sintase-endotelial
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
GC	Grupo controle
GLU	Ácido glutâmico
Hb	Hemoglobina
HbC	Hemoglobina C
HbD	Hemoglobina D
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HU	Hidroxiureia
IAP	Proteína associada à integrina
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
LACT	Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas
LCR	<i>Locus Control Region</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
LPHGDH	Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas

MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MSH	<i>Multicenter Study of Hydroxyurea</i>
MyD88	Fator de diferenciação primária mieloide 88
NET	Armadilhas extracelulares dos neutrófilos
NF-κB	Fator nuclear Kb
NK	Células <i>natural killers</i>
NLR	Relação Neutrófilo-Linfócito
NO	Óxido nítrico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PLR	Relação Plaquetas-linfócitos
PS	Fosfatidil serina
RDW	Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> 1
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará
VAL	Valina
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
VCM	Volume corpuscular médio

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
<	Menor que
>	Maior que
Kg	Quilogramas
m	Metros
mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
mg	Miligramas
dL	Decilitro
fL	Fentolitro
pg	Picograma
KDa	Quilodaltons
g	Gramas
n	Número
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kappa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 Hemoglobinopatias</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 Anemia Falciforme</b> .....	<b>20</b>
2.2.1 Histórico da Anemia Falciforme.....	20
2.2.2 Epidemiologia .....	22
2.2.3 Fisiopatologia .....	25
2.2.4 Diagnóstico .....	29
2.2.5 Tratamento.....	33
<b>2.3 Interleucina 18 (IL-18) e anemia falciforme</b> .....	<b>39</b>
<b>2.4 Interferon-gama (IFN-<math>\gamma</math>) e Anemia falciforme</b> .....	<b>44</b>
<b>3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>46</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>48</b>
<b>4.1 Objetivo geral</b> .....	<b>48</b>
<b>4.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>48</b>
<b>5. METODOLOGIA</b> .....	<b>49</b>
<b>5.1 Aspectos Éticos</b> .....	<b>49</b>
<b>5.2 Tipo de estudo</b> .....	<b>49</b>
<b>5.3 Local do estudo</b> .....	<b>49</b>
<b>5.4 População de estudo</b> .....	<b>50</b>
<b>5.5 Critérios de inclusão e exclusão</b> .....	<b>50</b>
<b>5.6 Coleta de dados e amostra</b> .....	<b>51</b>
5.6.1 Coleta das amostras biológicas.....	51
5.6.2 Informações clínicas, laboratoriais e demográficas .....	51
<b>5.7 Análise das citocinas: IL-18 e IFN<math>\gamma</math></b> .....	<b>52</b>
<b>5.8 Análise estatística</b> .....	<b>52</b>
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
<b>6.1 Análise dos dados demográficos e clínicos</b> .....	<b>54</b>

<b>6.2 Parâmetros laboratoriais .....</b>	<b>55</b>
<b>6.3 Dosagem sérica de IL-18 e IFN-<math>\gamma</math> .....</b>	<b>60</b>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA .....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma das doenças hematológicas mais comuns em todo o mundo. Manifestações clínicas da doença apresentam-se desde os primeiros meses de vida do paciente e se prolongam ao longo dos anos. Crises de dor aguda, episódios de vaso-oclusão, ulcerações em membros inferiores, acidente vascular cerebral, lesões em órgãos e sistemas, anemia hemolítica, dentre outros, são algumas das manifestações clínicas da AF (MANGLA *et al.*, 2022).

No cenário brasileiro, essa enfermidade configura-se como uma significativa questão de saúde pública, manifestando-se através de taxas elevadas de mortalidade. Dados registrados indicam uma média de um óbito diário em consequência da doença falciforme. Cálculos estimativos sugerem que aproximadamente de 60 a 100 mil cidadãos brasileiros têm o diagnóstico, com maior incidência nos estados do Piauí, Bahia e Distrito Federal (BRASIL, 2022).

O diagnóstico pode ser realizado gratuitamente já nos primeiros dias após o nascimento da criança, através do teste do pezinho (BRASIL, 2016) e o tratamento farmacológico principal se dá a partir da administração de Hidroxiureia (HU), que faz com que o paciente tenha uma melhora das crises de dor aguda, além de diminuição do processo inflamatório ocasionado pela doença (MONUS; HOWELL, 2019).

A AF é causada pela homozigose do alelo beta-S ( $\beta S$ ), que difere do alelo selvagem por consequência de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), no qual a timina (T) é substituída por adenina (A) no sexto códon do gene da  $\beta$ -globina, localizado no cromossomo 11, o que gera a produção de valina, um aminoácido com características hidrofóbicas. Esse processo resulta em um tetrâmero de hemoglobina mutante HbS ( $\alpha 2\beta s 2$ ), responsável pelo formato típico das hemácias observada no esfregaço sanguíneo de pacientes com AF (PICCIN *et al.*, 2018). Outros processos fisiopatológicos envolvidos na doença são a disfunção endotelial com aparecimento de crises vaso-oclusivas (CVO) e a hemólise (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

A expressão de moléculas de adesão na superfície das hemácias favorecem os episódios de CVO, que conseqüentemente, ativam outras moléculas de adesão e contribuem para o recrutamento de células do sistema imune, como os neutrófilos, monócitos e plaquetas, iniciando o processo inflamatório. A inflamação contínua aumenta a expressão de mais moléculas de adesão no endotélio (PICCIN *et al.*, 2018; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

Outra característica inflamatória da doença é quando ocorre a lise da célula falciforme, liberando hemoglobina (Hb) e ferro heme. A Hb liberada causa depleção do óxido nítrico (NO), diminuindo a sua biodisponibilidade no endotélio vascular. Qualquer redução de NO, resulta em um aumento de citocinas pró-inflamatórias o que pode levar à ocorrência de complicações do quadro do paciente (NADER; ROMANA; CONNES, 2020). O heme liberado, além de produzir mais moléculas de adesão, ativa um complexo de moléculas sinalizadoras que controlam a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias, denominado de inflamassoma. O inflamassoma NLRP3 é um dos mais caracterizados e, uma vez ativado, promove ativação da caspase 1, que cliva as formas inativas da interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 18 (IL-18), convertendo-as em suas formas ativas (ALMEIDA, 2017).

A IL-18 pertence a família da IL-1 e é uma citocina pró-inflamatória capaz de induzir a produção de IFN $\gamma$ , facilitando as respostas imunológicas tanto de células Th1 (em sinergismo com a IL-12) como de células Th2 (em sinergismo com a IL-2) (YOSHIMOTO *et al.*, 1997; DINARELLO *et al.*, 1998). Portanto, a presença de IL-18 está associada em diversos processos patológicos (incluindo a anemia falciforme) e pode ser considerada como um biomarcador de processo inflamatório (ZHABYEYEV; OUDIT, 2021).

Alguns estudos relacionam a presença de níveis elevados de IL-18 em pacientes com anemia falciforme (SIRANSY *et al.*, 2023; GUPTA *et al.*, 2021; PITANGA *et al.*, 2021; AZEVEDO *et al.*, 2021; ALMEIDA, 2017). Diante desse contexto, torna-se relevante compreender os efeitos inflamatórios dessa citocina a partir da análise de parâmetros hematológicos em pacientes com AF. Considerando a elevada prevalência da doença no Brasil, esse tipo de investigação pode contribuir significativamente para o entendimento dos mecanismos que modulam sua gravidade, oferecendo subsídios para o aprimoramento do diagnóstico laboratorial, o desenvolvimento de políticas públicas de saúde e a melhoria do prognóstico clínico.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

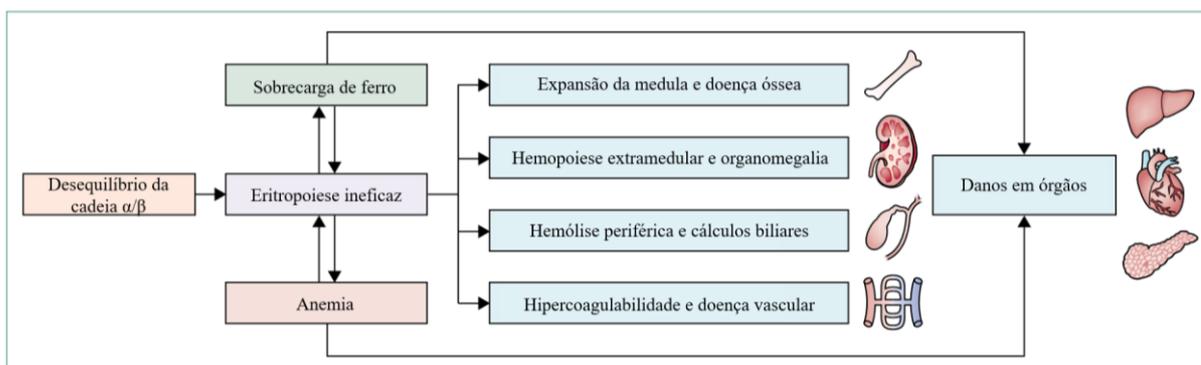
### 2.1 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias compreendem um conjunto de doenças hereditárias que têm como característica principal um traço defeituoso de hemoglobina (Hb), oriundo de mutações genéticas responsáveis pela formação das cadeias de globinas ou nas suas regiões regulatórias. Englobam as doenças hereditárias mais comuns em todo o mundo, com cerca de 270 milhões de portadores. Estima-se que 1% das gestações correm risco de desenvolvimento de hemoglobinopatias, resultando em 330.000 recém-nascidos afetados a cada ano. As hemoglobinopatias mais frequentes na clínica correspondem a  $\beta$ -talassemias e a doença falciforme (DF) (MAGRIN; MICCIO; CAVAZZANA, 2019; DE SANCTIS, 2021). Outros tipos de hemoglobinopatias como a doença da hemoglobina C (HbC), a doença da Hemoglobina D (HbD) a doença da hemoglobina fetal (HbF) são menos prevalentes (KOHNE, 2011).

A  $\beta$ -talassemia corresponde a cerca de 17% dos casos de hemoglobinopatias. Se dá a partir de uma alteração no cromossomo 11 (que codifica as globulinas  $\beta$ ) na cadeia de hemoglobina. Na hemoglobina normal, a razão de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  é de 1:1. Quando há um desequilíbrio entre as cadeias, onde a quantidade de  $\alpha$  globulinas é superior à quantidade de  $\beta$  globulinas, tem-se o desenvolvimento da  $\beta$ -talassemia (TAHER; WEATHERALL; CAPPELLINI, 2018).

Os pacientes com essa condição podem ser categorizados de acordo com a gravidade do quadro da doença, que pode ser classificada em talassemia maior (*major*), talassemia menor (*minor*) e intermediária. Essa classificação é baseada na severidade do desequilíbrio de cadeias de  $\alpha$  e  $\beta$  globulinas (POLAINAS, 2017). Já foram identificadas mais de 200 mutações no gene da globulina  $\beta$  que causam a doença, levando a mutações que podem ser silenciosas, leves ou graves, esta última, resulta na ausência completa da síntese de cadeias  $\beta$  globulina. O desequilíbrio dessas cadeias leva a uma eritropoiese ineficaz gerando uma série de danos aos tecidos e órgãos dos pacientes acometidos (TAHER; WEATHERALL; CAPPELLINI, 2018). A figura 1 ilustra a fisiopatologia de pacientes com síndromes de talassemia.

**Figura 1:** Fisiopatologia de pacientes com síndromes de talassemia.



Fonte: TAHER; WEATHERALL; CAPPELLINI (2018).

Outra hemoglobinopatia importante é a doença falciforme. Assim como a  $\beta$  talassemia, é desenvolvida quando há uma mutação pontual no cromossomo 11 da cadeia  $\beta$ -globulina. Essa mutação, consiste na substituição de GAG por GTG no sexto códon do gene da  $\beta$ -globulina, que resulta em uma troca do nucleotídeo adenina pelo nucleotídeo timina, que, ao invés de traduzir o aminoácido hidrofílico ácido glutâmico (GLU), sintetiza o aminoácido hidrofóbico valina (VAL), gerando, conseqüentemente, um tetrâmetro de hemoglobina S mutado, que causa prejuízos a reologia e sobrevivência dos eritrócitos (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019; LAURENTINO, 2020). A anormalidade eritrocitária na doença falciforme se manifesta clinicamente através da apresentação de anemia hemolítica e ciclos de vaso-oclusão que tem como complicação uma lesão de isquemia do órgão-alvo e infarto (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

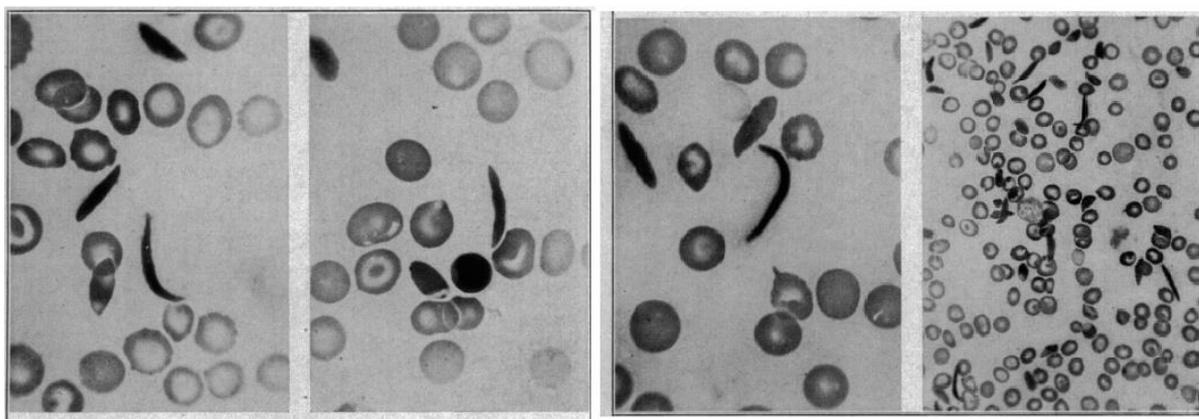
## 2.2 Anemia Falciforme

### 2.2.1 Histórico da Anemia Falciforme

Apesar da origem desconhecida, os sintomas da anemia falciforme são conhecidos há séculos pelos povos de diferentes regiões da África, mesmo antes de ser reconhecidos no hemisfério ocidental. Há evidências de que em 1670 os indivíduos da região de Gana já tinham conhecimento sobre os sintomas que eram causados nesta condição (KONOTEY-AHULU, 1973). Mas somente décadas mais tarde, que essa doença foi descrita oficialmente pela primeira vez.

O primeiro caso documentado e registrado de célula falciforme na medicina ocidental foi descrito em 1910, pelo cientista Dr. John Herrick, nos Estados Unidos, a partir de um esfregaço sanguíneo de um homem afrodescendente de 20 anos, portador de anemia grave (Figura 2) (HERRICK, 1910). Sete anos mais tarde, Emmel observou *in vitro* o fenômeno da mudança de células sanguíneas para o formato de foice, posteriormente denominada drepanócito, nos membros de uma mesma família, que gerou a descoberta da doença sendo uma condição hereditária (EMMEL, 1917). Em 1923, o pesquisador Huck, concluiu em seu estudo que o fenômeno da célula falciforme foi herdado como uma característica autossômica recessiva mendeliana (HUCK, 1923). Outra descoberta importante sobre a doença foi feita em 1927. Estudos experimentais explicaram que o formato de foice observado nos eritrócitos se dava pela privação de oxigênio (HAHN; GILLESPIE, 1927).

**Figura 2:** Esfregaço sanguíneo de células falciformes.



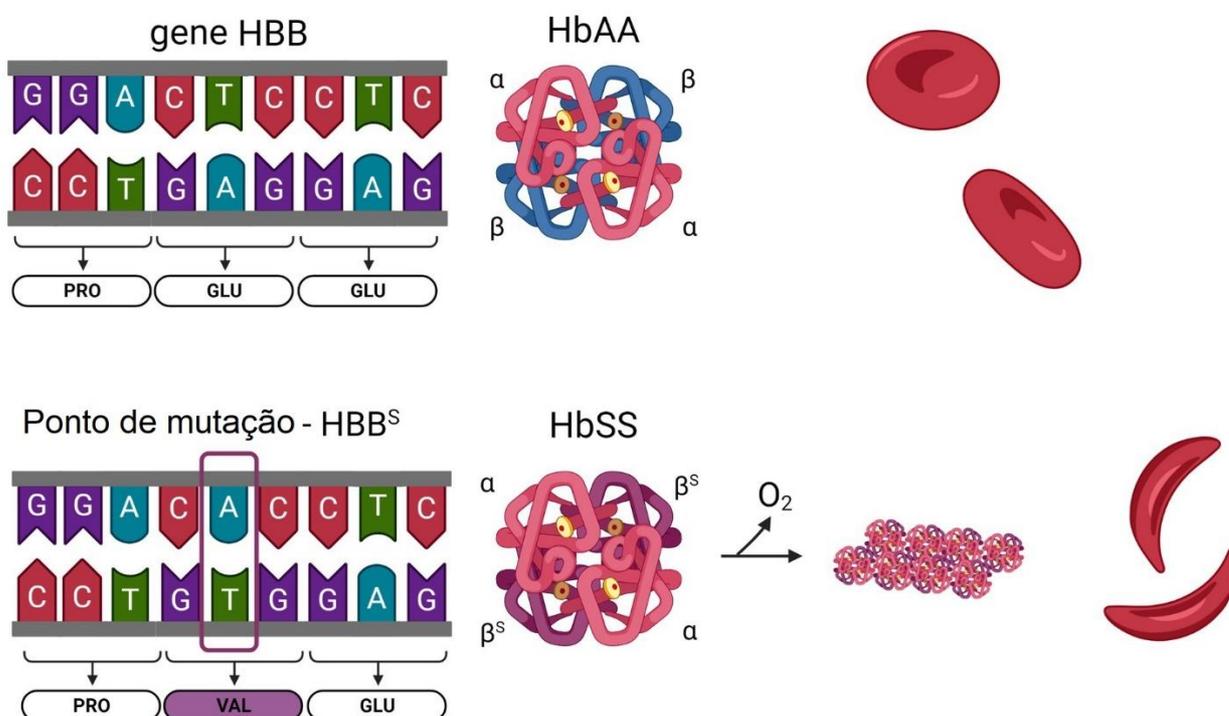
Fonte: HERRICK (1910).

Linus Pauling foi o primeiro cientista a criar a hipótese de que a doença teria origem a partir de uma anormalidade na estrutura da molécula de hemoglobina. Sua hipótese foi validada em 1949, num estudo em que foi demonstrado que hemoglobina falciforme (HbS) apresentava migração diferente da hemoglobina normal quando submetida à eletroforese em gel (PAULING *et al.*, 1949).

Mais tarde, em 1950, Ingram e colaboradores descobriram que a hemoglobina falciforme mutante (HbS) diferia da hemoglobina A normal por um único aminoácido, devido a substituição da base nitrogenada timina por adenina no DNA, que, ao invés de produzir o códon GAG, produz o códon GTG, traduzindo o aminoácido valina no lugar do ácido glutâmico (Figura 3). Nos anos de 1970, foram

criados os primeiros Centros Abrangentes de Anemia Falciforme (*Comprehensive Sickle Cell Centers*), nos Estados Unidos, que significou um marco de grande importância no desenvolvimento de métodos e estratégias para desvendar tratamentos e descrever melhor a história natural da doença (PACE; STARLARD-DAVENPORT; KUTLAR, 2021).

**Figura 3:** Substituição do ácido glutâmico por um resíduo de valina na posição 6 na cadeia polipeptídica da  $\beta$ -globina caracterizando a hemoglobina anormal (HbS). Essa alteração resulta de uma mutação causada por um único nucleotídeo no gene HBB, responsável pela codificação da  $\beta$ -globina.



Fonte: RAMADAS; SPARKENBAUGH (2023).

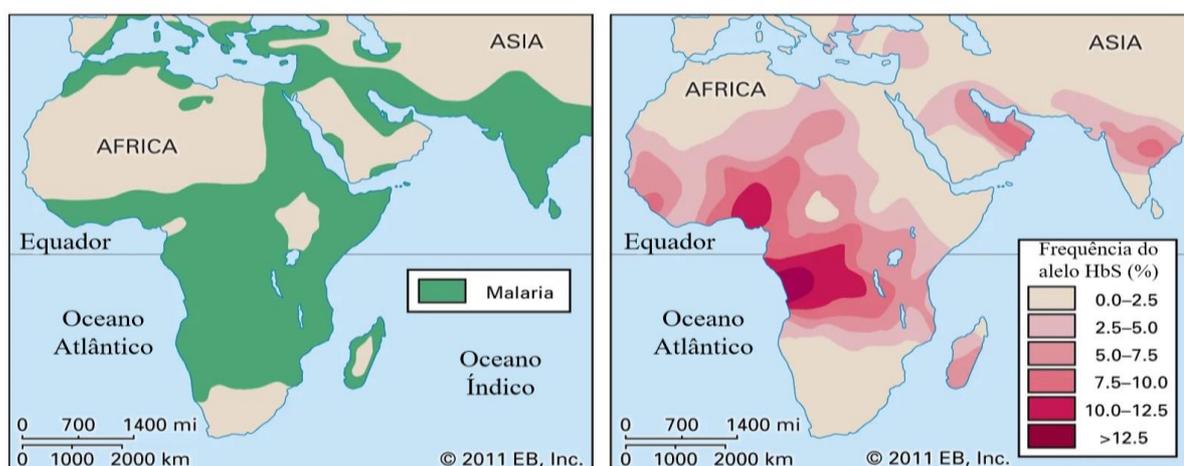
### 2.2.2 Epidemiologia

As doenças falciformes atingem milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente aquelas cujos descendentes são oriundos dos países africanos, da América latina, Arábia Saudita, Índia e países mediterrâneos, como a Grécia, Itália e Turquia (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022). Em certas

áreas da África-Subsaariana, até 2% das crianças nascem com a doença, onde o gene mutante é herdado tanto do pai como da mãe (homozigose para o gene da hemoglobina falciforme (HbS)). A presença do traço falciforme (heterozigose para a mutação da célula falciforme no HBB) também é bastante prevalente na região africana. Na África Equatorial, a prevalência da doença sofre variação entre 10% e 40%, enquanto na África do Norte, a prevalência do traço falciforme varia entre 1% e 2%. Já na África do Sul, esse dado diminui para menos de 1%. Essa variação encontrada em diferentes partes do continente tem relação com o fato do traço falciforme conferir vantagens para a sobrevivência contra a malária, muito comum nas regiões onde a doença falciforme apresenta uma maior predominância (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

Embora os mecanismos exatos responsáveis por essa proteção ainda não estejam completamente elucidados, a “hipótese da malária”, formulada por Haldane em 1949, permanece em debate e é frequentemente citada como um exemplo de seleção natural. Considerando que a malária afeta diretamente as células sanguíneas, qualquer alteração da estrutura celular pode dificultar a propagação da doença (PIEL *et al.*, 2017). A figura 4 apresenta um mapa comparativo da distribuição de malária *versus* anemia falciforme no continente africano. É possível notar que as áreas onde têm mais malária se sobrepõem às áreas onde há uma maior frequência de AF, associado ao fato de que os indivíduos com traço falciforme contraem a malária com menos frequência e menos severidade (KATO *et al.*, 2018).

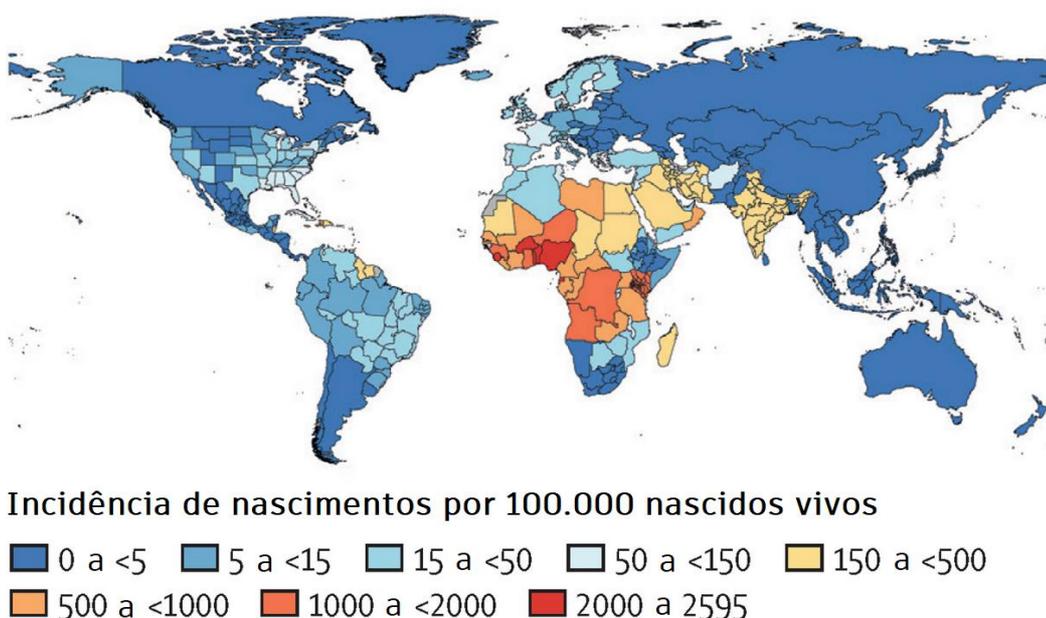
**Figura 4:** Distribuição de malária *versus* anemia falciforme no continente africano.



Fonte: BRITANNICA (2022).

Além da África, outras regiões do mundo também apresentam casos de pessoas com anemia falciforme. Devido ao tráfico de pessoas escravizadas e movimentos migratórios, a doença se espalhou muito além de suas origens. Não há um número exato de quantas pessoas têm a doença, mas um estudo publicado em 2023, estima que aproximadamente 515.000 bebês nasçam todo ano com doença falciforme. A grande maioria desses nascimentos ocorrem sobretudo, na África Subsaariana e no Caribe. Entre 2000 e 2021, a prevalência global aumentou 41,4%, passando de 5,46 milhões para 7,74 milhões de pessoas vivendo com a enfermidade (GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY 2021, 2023) A figura 5 mostra a incidência do número de nascimentos com doença falciforme com escala mundial.

**Figura 5:** Incidência do número de recém-nascidos com doença falciforme em 2021.



Fonte: THOMSON *et al.* (2023).

No Brasil, a anemia falciforme representa um importante problema de saúde pública. Dados da Secretaria de Estado de Saúde do Mato Grosso do Sul apontam que a AF ocorre em 1 a cada 1.200 nascimentos e que cerca de 8% da população negra possui a doença. A detecção se dá a partir da realização do teste de pezinho, feita nos primeiros dias após o nascimento (SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO MATO GROSSO DO SUL, 2021).

Um estudo desenvolvido por Mota *et al.*, (2022), analisou a tendência da mortalidade por anemia falciforme no Brasil, utilizando dados epidemiológicos do

Sistema de Informações sobre Mortalidade. Os resultados indicaram que indivíduos pardos apresentavam maior taxa de mortalidade (50,87%), com predomínio do sexo masculino, com idades entre 25 e 34 anos. Outro estudo, realizado por Santo (2022), apontou que as regiões Sudeste e Nordeste apresentam as maiores taxas de mortalidade associadas à doença.

No Ceará, dados epidemiológicos apontam que a maior parte dos pacientes diagnosticados com a doença pertencem capital Fortaleza e sua região metropolitana, com cerca de 74,4% dos casos notificados, segundo dados publicados em 2021. Outras cidades como Crato, Sobral, Iguatu e Quixadá, apresentam cerca de 11,4%; 9,7%; 3% e 1,5%, dos casos notificados, respectivamente (SANTOS *et al.*, 2021).

### 2.2.3 Fisiopatologia

A anemia falciforme é uma doença que tem como principal sintoma o aparecimento de dores intensas, oriunda de crises vaso-oclusivas (CVO). Todos os pacientes com anemia falciforme passou ou passará por alguma CVO. Complicações da AF incluem: síndrome aguda torácica, acidente vascular cerebral, crises aplásticas, infecções, úlceras na perna, hipertensão arterial pulmonar, complicações renais, dentre outros (MANGLA *et al.*, 2022).

Durante décadas, os cientistas elencaram os três principais processos fisiopatológicos envolvidos em decorrência do desenvolvimento de AF: a polimerização da hemoglobina S (HbS), a vaso-oclusão e a disfunção endotelial mediada por hemólise (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

A polimerização da hemoglobina S é a responsável pelo formato típico de foice das células eritrocitárias na anemia falciforme. Esse processo se inicia durante a desoxigenação da hemoglobina, onde ocorre uma interação da valina com os receptores hidrofóbicos nas moléculas de cadeias  $\beta$  adjacentes. Essa interação promove a formação dos polímeros (PICCIN *et al.*, 2018), que crescem rapidamente e formam longas fibras que aumentam e distorcem a membrana das hemácias, levando à mudança de forma (drepanócitos) e hemólise. Após a reoxigenação, a polimerização é desfeita e o eritrócito retorna ao seu estado normal (forma bicôncava). Entretanto, episódios frequentes de polimerização e despolimerização, em decorrência da oxigenação e desoxigenação, levam à formação de lesões

permanentes nas membranas das hemácias, causando rigidez e fazendo com que a configuração falciforme da célula se mantenha mesmo após a reoxigenação (WILLIAMS; THEIN, 2018; MACHADO *et al.*, 2021).

Duas variáveis são responsáveis pela taxa de polimerização da hemoglobina: a concentração eritrocitária de HbS e a concentração de hemoglobina fetal (HbF –  $\alpha_2\gamma_2$ ). Uma é inversamente proporcional à outra (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

A HbF é a hemoglobina predominante durante o estágio fetal. Seus níveis são bastante elevados durante o nascimento e suas taxas vão diminuindo gradativamente, atingindo cerca de 2% ainda no primeiro ano de vida da criança. Na vida adulta, as taxas de HbF variam entre 1 e 2%. Apresentam um papel importante na AF, pois evita lesões eritrocitárias, protegendo essas células dos danos causados pela polimerização (SEBASTIANI; STEINBERG, 2022). Quanto mais altos os níveis de HbF, menor o grau de polimerização da hemoglobina e melhores os desfechos clínicos e os parâmetros hematológicos na AF, uma vez que a HbF reduz a concentração de HbS e inibe a copolimerização entre tetrâmeros de hemoglobina (SALES *et al.*, 2022).

Os eritrócitos deformados têm uma maior dificuldade em passar através da microvasculatura, o que resulta em oclusão vascular, levando à isquemia e hipóxia, seguido de dano e inflamação tecidual. Entretanto, a obstrução mecânica é apenas um dos eventos responsáveis pela vaso-oclusão característica dos pacientes com anemia falciforme (WILLIAMS; THEIN, 2018; SEDRAK; KONDAMUDI, 2021).

Na década de 70, Eaton e Hofrichter propuseram que o mecanismo fundamental para os episódios de crises vaso-oclusivas se dava devido à retenção de hemácias na microvasculatura, em consequência da redução do fluxo sanguíneo local. Eritrócitos normais são flexíveis e se distorcem para passar através dos capilares para transportar o oxigênio aos tecidos. Da mesma forma, as células contendo HbS também fazem esse transporte. Contudo, quando passam pelo processo de desoxigenação, assumem um padrão rígido e não deformável devido a polimerização das moléculas de hemoglobina. O intervalo de tempo entre a desoxigenação e a polimerização permite que algumas células escapem dos pequenos vasos para vasos mais calibrosos antes mesmo que a polimerização ocorra. Assim, se o tempo de polimerização for menor que o tempo de transporte, a vaso-oclusão ocorre. Da mesma forma, quando o fluxo sanguíneo local diminui, o tempo de

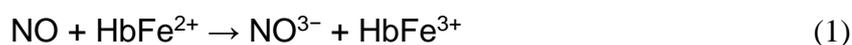
trânsito das células pela microvasculatura se prolonga, e a mudança no formato das células ocorre antes mesmo de sair dos capilares, gerando, conseqüentemente, a vaso-occlusão (VELUSWAMY *et al.*, 2019; COATES *et al.* 2018).

A expressão de moléculas de adesão na superfície celular é um dos eventos mais importantes relacionados à vaso-occlusão na AF. Hemácias falciformes se aderem à superfície endotelial, bem como aderem umas às outras, formando um emaranhado de células que aumentam a oclusão do vaso. Moléculas de adesão como a fosfatidil serina (PS), proteína associada à integrina (IAP) e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) são expressas na superfície das células e podem aumentar ainda mais sua expressão durante as crises oclusivas. (PICCIN *et al.*, 2018; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019). A ativação e o aumento de neutrófilos, monócitos e plaquetas no endotélio das vênulas e capilares também estão correlacionadas à inicialização da oclusão (NADER; ROMANA; CONNES, 2020). Os processos inflamatórios contínuos podem contribuir ainda mais para a expressão de moléculas de adesão. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 18 (IL-18), por exemplo, aumentam a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) no endotélio (PICCIN *et al.*, 2018).

O óxido nítrico (NO) também desempenha um papel importante no processo de vaso-occlusão e fisiopatologia da AF. É sintetizado a partir da atividade da NO-sintase-endotelial (eNOS) e desempenha funções na vasodilatação, efeito inibitório na regulação da transcrição de moléculas de adesão (como a ICAM-1, VCAM-1 e selectinas) e inibição da ativação plaquetária. A bioatividade e biodisponibilidade do NO é comprometida quando a célula falciforme entra em hemólise (NADER; ROMANA; CONNES, 2020).

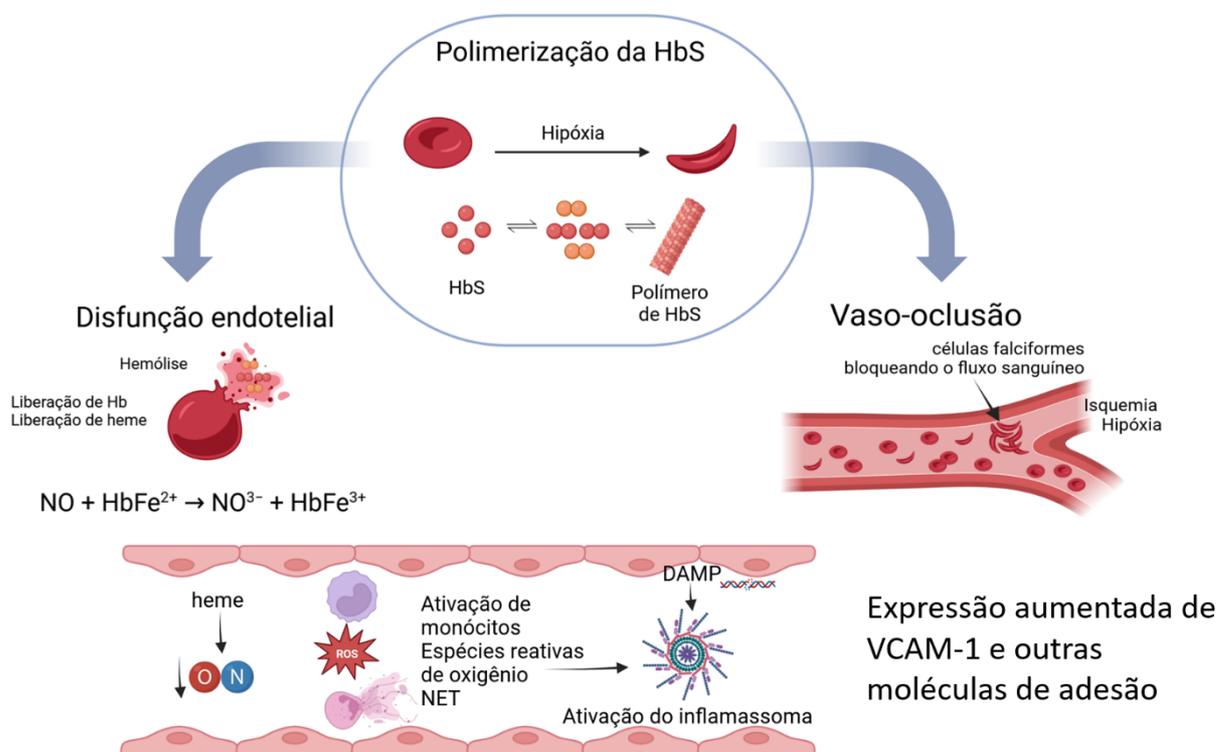
A hemólise é um processo corriqueiro nos pacientes com AF. Quando os eritrócitos deformados são comprimidos devido à mudança no formato celular, a membrana é destruída e tem-se a liberação de polímeros de Hb na circulação. Além disso, a hemácia falciforme tem a membrana bem mais frágil comparada com àquelas em condições normais. É importante frisar que o tempo de meia-vida de uma hemácia comum é de cerca de 120 dias, enquanto o da hemácia falciforme gira em torno de 16 dias apenas (WILLIAMS; THEIN, 2018). A dosagem da combinação de alguns biomarcadores como a lactato desidrogenase (LDH), bilirrubina total, contagem de reticulócitos e hemosiderina urinária são importantes para analisar o grau de hemólise intravascular do indivíduo (NOURAIE *et al.* 2013).

A Hb liberada durante a hemólise causa diminuição dos níveis circundantes de NO. O mecanismo responsável por essa redução se dá a partir da reação irreversível de oxidação da hemoglobina oxigenada ( $\text{Fe}^{2+}$ ) com o NO, que gera nitrato e metahemoglobina ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Equação 1) (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019). Ademais, a hemólise causa a liberação da arginase, que causa a hidrólise da arginina, que é precursora do NO, diminuindo mais ainda a biodisponibilidade do óxido nítrico no endotélio. Por ser um potente vasodilatador e um fator relaxante derivado do endotélio, qualquer diminuição do NO resulta em disfunção vascular, piorando as crises vaso-oclusivas, além de aumentar o risco para ocorrência de priapismo, acidente vascular cerebral, hipertensão pulmonar e úlceras na perna (NADER; ROMANA; CONNES, 2020; OFORI-ACQUAH, 2020).



A exposição do endotélio ao heme liberado na hemólise leva a produção de mais moléculas de adesão, incluindo a ICAM-1, P-selectina e fibronectina. Além disso, leva à ativação dos neutrófilos e a formação de NET (Armadilhas extracelulares dos neutrófilos, do inglês *Neutrophil extracellular traps*), que também acabam lesionando a microvasculatura (WILLIAMS; THEIN, 2018). O dano endotelial altera a parede do vaso e pode causar fluxo turbulento. Isso pode expor o colágeno subendotélio aumentando a adesão celular-endotélio, com consequente vaso-oclusão. De fato, crises vaso-oclusivas são as principais responsáveis pelos episódios recorrentes de dores intensas nos pacientes portadores da AF (PICCIN *et al.*, 2018). A figura 6 resume a fisiopatologia da AF, onde a polimerização, vaso-oclusão e disfunção endotelial são mostradas.

**Figura 6:** Fisiopatologia da anemia falciforme.



Legenda: DAMP (Damage-associated molecular patterns): Padrões moleculares associados a danos; HbS: hemoglobina falciforme; NET (Neutrophil extracellular traps): Armadilhas extracelulares dos neutrófilos; NO: óxido nítrico; VCAM-1 – molécula de adesão celular vascular 1; ROS – espécies reativas de oxigênio.  
 Fonte: Adaptado de SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019 e SHET; LIZARRALDE-IRAGORRI; NAIK, 2020.

## 2.2.4 Diagnóstico

Os métodos de diagnóstico para a detecção da anemia falciforme podem ser divididos em quatro estágios, de acordo com o período da detecção da doença: preconcepção, pré-natal, neonatal e pós neonatal. O período de preconcepção é aquele em que o nascimento do filho ainda está em planejamento. Nesse caso, o casal faz um teste para rastrear se carrega ou não o gene para desenvolvimento da anemia falciforme (traço falciforme). Técnicas laboratoriais utilizadas são a eletroforese, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e focalização isoelétrica. Esses métodos permitem separar as espécies de hemoglobina de acordo com a sua estrutura química (KATO et al, 2018).

O período da realização dos testes pré-natais para a detecção da doença é durante os primeiros meses de gestação. Esses testes são relativamente seguros, porém têm a desvantagem de serem um pouco invasivos, pois requerem que uma amostra de DNA fetal seja retirada através da biópsia de vilosidades coriônicas. Técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e de HPLC são usadas para identificar o genótipo da futura criança (SINGH; SHRIVASTAVA; SHRIKHANDE, 2015).

No Brasil e em muitos outros países, a anemia falciforme pode ser diagnosticada pouco tempo após o nascimento do bebê (entre o 3º e 5º dia de vida), através do “teste do pezinho”, ou triagem neonatal, que além da AF, detecta outras doenças como a Hiperplasia Adrenal Congênita e Deficiência de Biotinidase, entre outras. Um diagnóstico precoce da doença permite que a criança tenha mais qualidade de vida, prevenindo complicações e sequelas, além de reduzir a mortalidade infantil (BRASIL, 2016).

Fatores que contribuem para o diagnóstico tardio (diagnóstico pós neonatal) podem incluir a negação por parte dos pais para a realização do teste do pezinho, população com baixo acesso aos serviços de saúde, desconhecimento sobre a doença, imigração, entre outros. Independentemente da situação, é comum o diagnóstico tardio ser realizado apenas mediante a apresentação de sinais e sintomas (KATO et al, 2018). Através do hemograma do paciente é possível notar alguns sinais da doença: anemia grave com hemoglobina e hematócrito baixos, leucocitose com neutrofilia, presença de drepanócitos no esfregaço sanguíneo e plaquetocitose. A contagem de reticulócitos podem variar de acordo com o grau de hemólise e resposta da medula óssea à anemia. Entretanto, somente o hemograma não é o suficiente para dar um diagnóstico definitivo para a doença. Assim, técnicas como a eletroforese de hemoglobina, HPLC, focalização isoelétrica e testes genéticos são necessários (ALMEIDA; BERETTA, 2017; ARISH; ALHADRAMI; ZOUROB, 2021).

Alguns achados analíticos também podem ajudar no diagnóstico da anemia falciforme. Um estudo realizado por Sant’Ana e colaboradores (2017), avaliou o perfil clínico e laboratorial de pacientes com anemia falciforme através de dados retirados de prontuários. Os autores analisaram a variação dos exames hematológicos comparando pacientes que fazem uso com aqueles que não fazem uso de hidroxiuréia (HU). Seus achados demonstraram que os níveis de hemoglobina e hematócrito foram diferentes entre os grupos, com resultados maiores no grupo de pacientes que

utilizavam o fármaco. Outras variáveis de exames hematológicos comparadas foram as contagens de neutrófilos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina fetal e ferritina. Os resultados, entretanto, não foram significativos (SANT'ANA *et al.*, 2017). Outras alterações laboratoriais encontradas nos pacientes com anemia falciforme incluem aumento de reticulócitos, leucócitos e plaquetas (SALES, 2017).

Ferreira *et al.* (2021) realizaram um estudo transversal com pacientes portadores de doença falciforme (fenótipos SS e S $\beta$ ) com o objetivo de verificar alterações osteoarticulares e suas associações com exames clínicos e laboratoriais. Foi observado nos pacientes do estudo alterações nos exames laboratoriais de ferritina, contagem de reticulócitos, proteína C reativa e lactato desidrogenase (LDH). Além disso, exames radiográficos mostraram apresentação de lesões ósseas, sobretudo na coluna, principalmente dos pacientes que não faziam uso crônico da HU.

Manifestações orais podem ocorrer com mais frequência nos pacientes com anemia falciforme. O aumento da formação de cáries pode estar relacionado com alterações na formação e calcificação do esmalte e dentina, uso crônico de fármacos contendo sacarose, além da quantidade reduzida de IgA e lisozima na saliva. Em alguns casos, o paciente apresenta coloração amarelada na gengiva, consequente da hiperbilirrubinemia, que ocorre quando há liberação da bilirrubina na destruição dos eritrócitos. Outras complicações orais incluem mudanças na densidade mineral óssea e neuropatia do nervo mentoniano (SILVA *et al.*, 2018).

Deste modo, pode-se identificar muitas técnicas para o diagnóstico da anemia falciforme. O quadro 1 (adaptado de ARISHI; ALHADRAMI; ZOUROB, 2021) resume as principais técnicas atuais para a detecção da doença, incluindo suas vantagens e desvantagens.

Além dos métodos convencionais, existem outros testes de diagnóstico menos comuns, mas igualmente eficazes na detecção da presença da doença. Dentre esses, destacam-se a citometria de fluxo fotoacústica, o genosensor eletroquímico e a técnica de pirosequenciamento. Recentemente, foram descritos dispositivos portáteis e rápidos, como plataformas baseadas em imunoenaios, separação por densidade e tecnologias baseadas em sensores. Independentemente do método utilizado, é fundamental correlacioná-lo com o estado clínico do paciente para garantir precisão no diagnóstico (ARISHI; ALHADRAMI; ZOUR, 2021).

**Quadro 1:** Técnicas atuais para a detecção da anemia falciforme.

<b>Técnica</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Esfregaço de sangue	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simples</li> <li>• Baixo custo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Habilidade pelo patologista</li> <li>• Não diferencia o tipo de DF</li> </ul>
Electroforese capilar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Confiável</li> <li>• Distingue a maioria dos tipos de DF</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caro</li> <li>• Habilidade pelo patologista</li> </ul>
HPLC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Confiável</li> <li>• Distingue a maioria dos tipos de DF</li> <li>• Automatizado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnostica erroneamente as variantes que imitam HbS</li> <li>• Caro</li> <li>• Precisa de pessoal treinado</li> </ul>
Focalização isoeétrica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detecta facilmente HbS em uma alta concentração de HbF</li> <li>• Pequeno volume de amostra</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caro</li> <li>• Precisa de pessoal treinado para interpretação dos resultados</li> </ul>
PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simples</li> <li>• Pode ser usado no diagnóstico pré-natal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixa sensibilidade;</li> <li>• Contaminação do DNA da célula materna</li> </ul>
Processamento de imagem	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método automatizado</li> <li>• Minimizar o erro de dependência a olho nu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não é possível distinguir entre diferentes tipos de DF</li> <li>• Não determina a gravidade da doença</li> <li>• Caro</li> <li>• Precisa de equipamentos especiais</li> </ul>

Legenda: DF: Doença falciforme; HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência; PCR: Reação em cadeia da polimerase. HbS: Hemoglobina S; HbF: Hemoglobina fetal.  
 Fonte: Adaptado de ARISHI; ALHADRAMI; ZOUROB (2021).

### 2.2.5 Tratamento

A descoberta da anemia falciforme nos primeiros estágios da vida do indivíduo tem grande importância para o manejo clínico da doença. Um diagnóstico precoce está relacionado com uma diminuição das taxas de mortalidade e aumento da qualidade de vida de seus portadores (PICCIN *et al.*, 2018).

Por ser uma doença que atinge múltiplos órgãos dos sistemas, é comum pacientes apresentarem complicações agudas e crônicas. As crises agudas ocasionadas pela vaso-oclusão podem ser desencadeadas por fatores como a hipotermia, desidratação, estresse, elevadas altitudes, entre outras. O manejo clínico para o controle dessas crises agudas, inicialmente, é a administração de medicamentos analgésicos. Além disso, o fornecimento de oxigenação ou hidratação também são necessários (MONUS; HOWELL, 2019). Além das crises de dor, outras complicações agudas incluem: síndrome torácica aguda, acidente vascular cerebral e sequestro hepático ou esplênico (KAPOOR; LITTLE; PECKER, 2018).

Complicações crônicas da AF abrangem lesões no cérebro, olhos, rins, pulmão e fígado. São complicações que requerem mais cuidados e necessitam de um aparato ambulatorial e hospitalar. Infelizmente poucas são as terapias existentes para tratamento eficaz da doença (KAPOOR; LITTLE; PECKER, 2018).

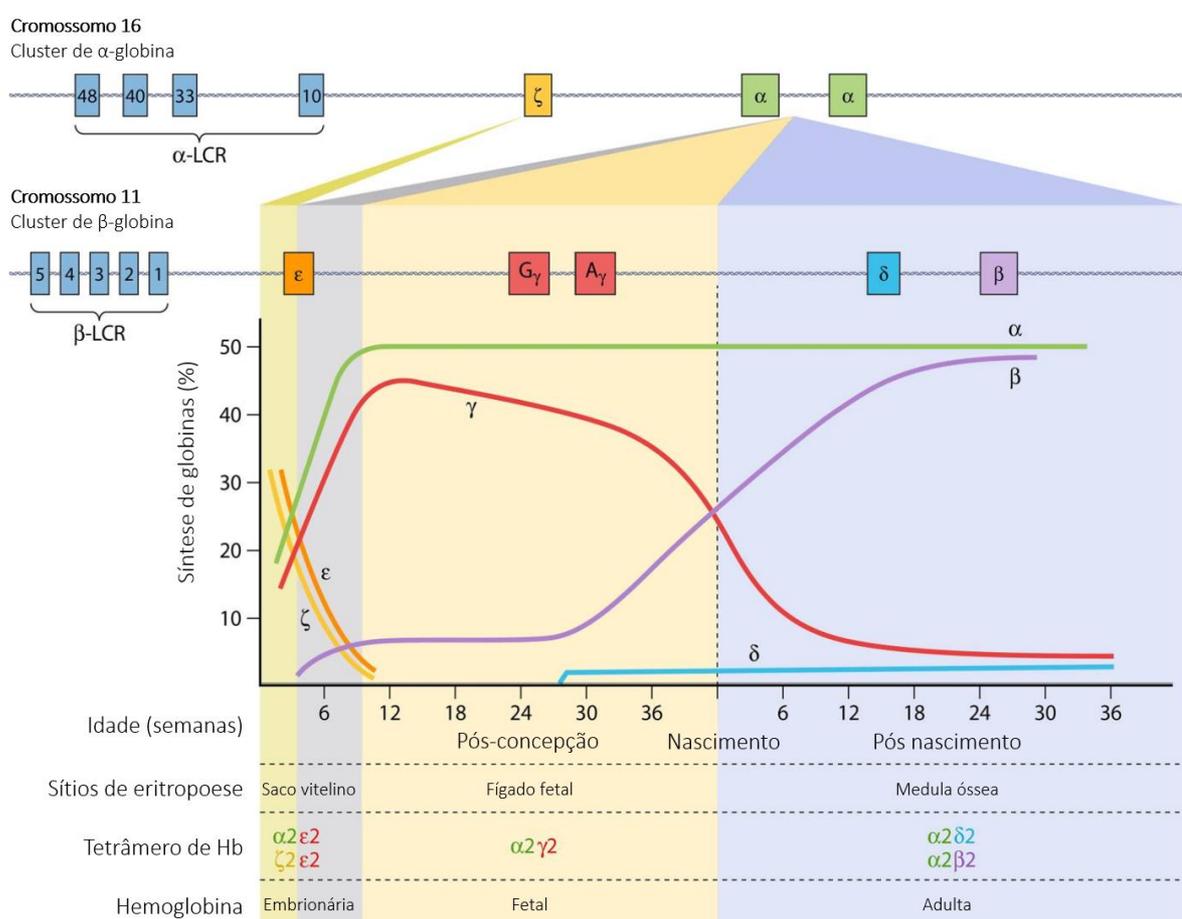
Os níveis de hemoglobina fetal estão diretamente relacionados com a evolução do quadro dos pacientes com anemia falciforme. Quanto maiores os níveis de HbF, menores as complicações. Outra característica importante é sua restrição a apenas uma pequena parcela dos glóbulos vermelhos (distribuição heterocelular). As células contendo a HbF são denominadas de células F (SEBASTIANI; STEINBERG, 2022).

Janet Watson, em 1948 descobriu que os eritrócitos de recém-nascidos portadores da AF, eram protegidos do processo de mudança de conformação celular e que os bebês, até a idade de cerca de 6 meses, não manifestavam a doença. Anos mais tarde, descobriu-se que esse processo se dava pelo nível aumentado de hemoglobina fetal (LETTRE; BAUER, 2016).

A HbF é a forma de hemoglobina prevalente durante a gravidez. Somente após o nascimento da criança, em um processo regulado por expressão gênica, é que a mesma vai sendo substituída pela HbA (ou HbS). Um tetrâmero de hemoglobina é formado por duas cadeias  $\alpha$  globinas e duas cadeias  $\beta$  globinas ( $\alpha_2\beta_2$ ). O cluster de

genes  $\beta$ -globina no cromossomo 11 inclui cinco genes  $\beta$ -like:  $\epsilon$ -globina,  $\zeta$ -globina,  $\gamma$ -globina,  $\delta$ -globina e  $\beta$ -globina. Na fase inicial da gravidez (primeiro trimestre) as cadeias de  $\epsilon$ -globina no cluster de  $\beta$ -globina são altamente expressas nas células eritróides. Em seguida, as cadeias de  $\epsilon$ -globina vão sendo substituídas pelas cadeias de  $\gamma$ -globina derivadas de células eritróides hepáticas fetais. A partir do nascimento em diante, há um decaimento nos níveis de expressão das cadeias  $\gamma$ -globina e um aumento da expressão das cadeias  $\beta$  globinas, que resulta na hemoglobina adulta (HbA). A figura 7 ilustra o processo de regulação gênica da globina  $\beta$ -like humana (VENKATESAN *et al.*, 2020).

**Figura 7:** Regulação gênica da globina  $\beta$ -like humana.



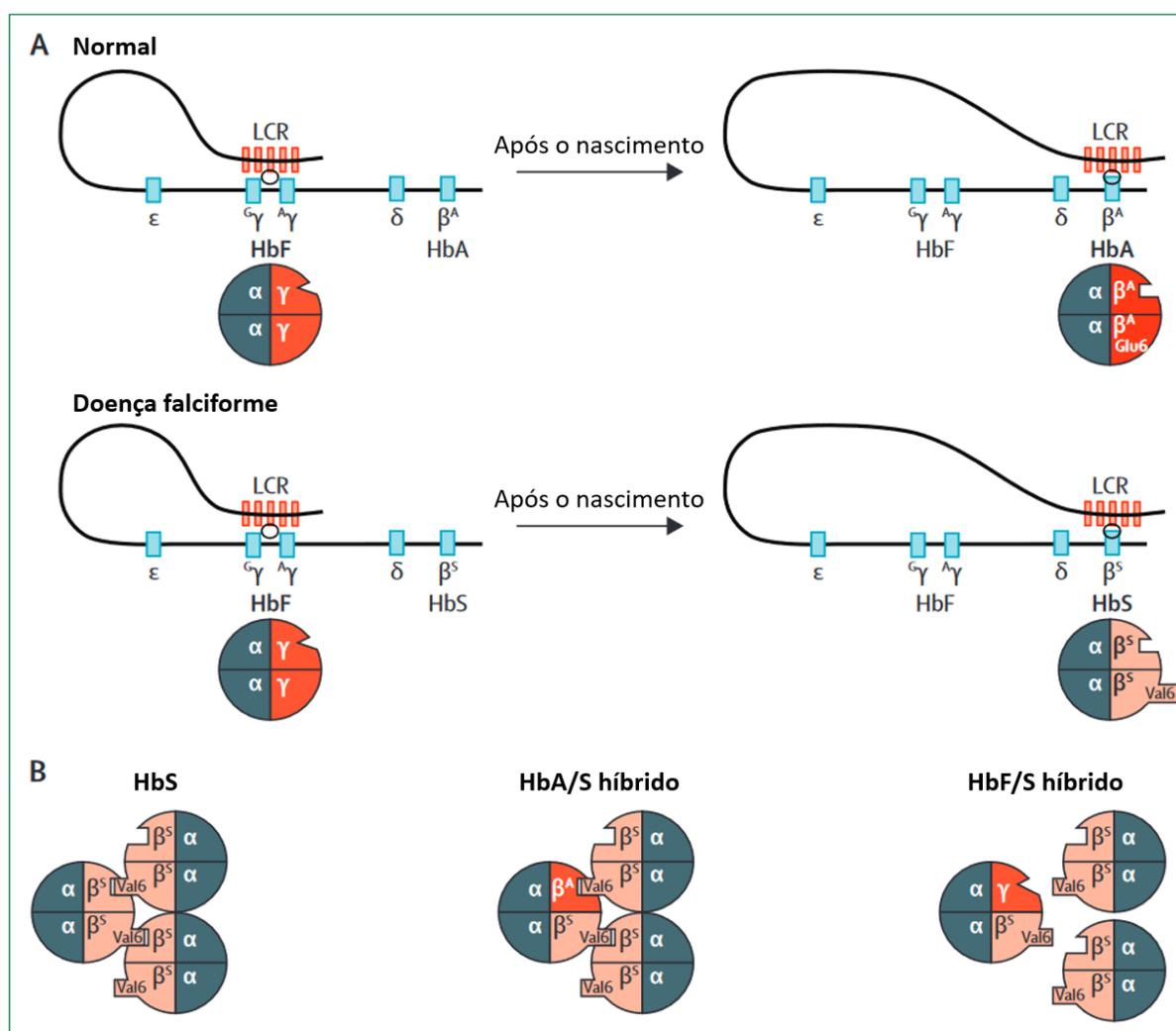
Legenda: LCR (*Locus Control Region*): Região de controle de lócus.

Fonte: VENKATESAN *et al.* (2020).

O polímero de hemoglobina falciforme consiste em uma fibra sólida com 7 pares de filamentos de tetrâmeros de HbS. A estabilização dessas fitas se dá pela interação hidrofóbica da valina na porção 6 da cadeia  $\beta$  a uma porção da cadeia

adjacente contendo uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos nas posições 85 a 88. Como a  $\gamma$ -globina presente na HbF tem uma glutamina ao invés de treonina na posição 87, a interação hidrofóbica dessas fitas é bem mais fraca. Como consequência, os tetrâmeros de HbF contendo cadeias de  $\gamma$ -globina tem menos probabilidade de copolimerar, enquanto os tetrâmeros de HbS tem mais probabilidade (Figura 8). Dessa forma, a hemoglobina fetal apresenta um efeito antifalciforme (LETTRE; BAUER, 2016).

**Figura 8:** Como a hemoglobina fetal inibe o processo de mudança na forma dos eritrócitos.



Legenda: A: hemoglobina predominante antes do nascimento em ambos os casos é a hemoglobina fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Após o nascimento a hemoglobina fetal vai sendo substituída pela HbA ou HbS. B: Polimerização sob condições de desoxigenação. LCR (*Locus Control Region*): Região de controle de locus

Fonte: LETTRE; BAUER (2016).

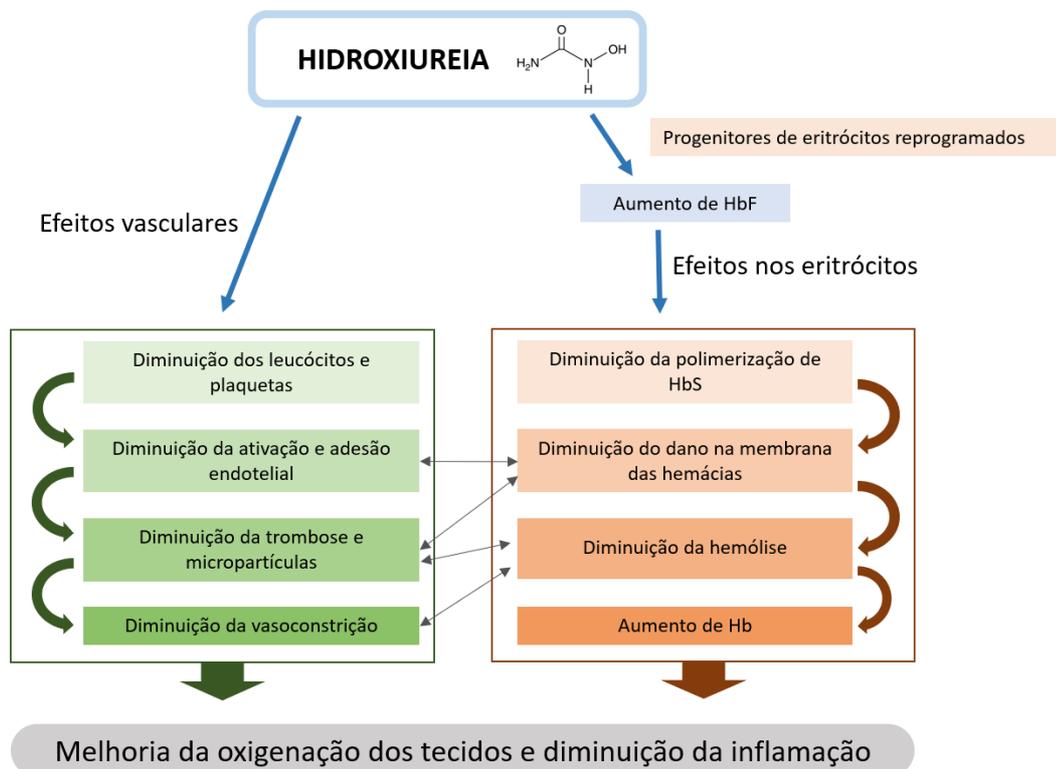
Nos últimos anos têm surgido muitos estudos genéticos envolvendo o gene da  $\beta$ -globina afim de se encontrar um tratamento para a anemia falciforme. A terapia genética se baseia na inserção de vírus ou lentivírus como vetores, que contêm um gene de  $\beta$ -globina de tipo selvagem, um promotor de  $\beta$ -globina e uma LCR. Estudos em modelo animais têm se mostrado bem-sucedidos (SEGURA *et al.* 2023). O primeiro caso exitoso reportado de estudos envolvendo terapias genéticas em humanos foi realizado em 2017, onde um adolescente de 13 anos em estado grave da doença, recebeu terapia genética usando o vetor  $\beta$ A-T87Q LV. Ele alcançou níveis suficientes de células-tronco modificadas por genes e apresentou uma melhora acentuada do quadro (BADAT; DAVIES, 2017). Outros pacientes, submetidos a mesma terapia, entretanto, não apresentaram melhora satisfatória (KANTER *et al.*, 2017).

Muitas descobertas importantes foram feitas e muitos estudos envolvendo o uso de vírus como ferramentas biológicas ainda estão em curso. Esses estudos são fundamentais para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da AF (SEGURA *et al.* 2023).

Atualmente, o único tratamento que pode curar de fato a anemia falciforme (bem como outras doenças hematológicas) é o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas. É mais indicado em casos sérios da doença, entretanto, raros são os casos em que é possível a realização do transplante. O número reduzido de doadores, a alta taxa de morbidade, as altas taxas de rejeição do enxerto e a escassez de estudos, são consideradas barreiras para a implementação em massa desse tratamento (AZEVEDO *et al.*, 2021).

A hidroxiuréia é o principal fármaco usado na terapia dos pacientes com AF. Seu uso acarreta uma melhora das crises dolorosas, além de aumentar as taxas de sobrevivência dos usuários (MONUS; HOWELL, 2019). Seu mecanismo de ação é complexo, mas pode ser categorizado em duas vias: aumento na produção de HbF e melhor fluxo sanguíneo através da redução da adesão intercelular (Figura 9) (GREEN; BARRAL, 2014).

**Figura 9:** Efeitos da hidroxiureia na anemia falciforme.



Legenda: Hb: Hemoglobina; HbF: Hemoglobina Fetal; HbS: Hemoglobina mutada (falciforme).

Fonte: Adaptado de GREEN; BARRAL (2014).

Em 1995, o *Multicenter Study of Hydroxyurea (MSH)* estudou a eficácia do fármaco em indivíduos adultos e o resultado foi bastante impactante: a incidência de episódios de dor aguda diminuíram em cerca de 40% e houve redução também nos índices de hospitalização e de síndrome torácica aguda. Esses resultados foram primordiais para a aprovação do fármaco, pela FDA (*Food Drug Administration*) em 1998, no tratamento de pacientes sintomáticos com a doença falciforme (GREEN; BARRAL, 2014).

O fármaco induz o aumento da expressão gênica de  $\gamma$ -globina em células eritroides humanas. Subsequentemente, as cadeias  $\gamma$ -globinas podem se juntar às cadeias  $\alpha$ -globinas nas células vermelhas para formar HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ). As células com altos níveis de HbF (entre 20 e 25%) tem a capacidade de escapar do processo de formação de drepanócitos. A diminuição da polimerização, a diminuição do dano à membrana dos eritrócitos e a diminuição da hemólise têm como consequência a

melhora da oxigenação dos tecidos e diminuição da inflamação (YASARA; PREMAWARDHENA; METTANANDA, 2021).

A HU é um inibidor da enzima ribonucleotídeo redutase, que converte os ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos. Essa inibição gera uma diminuição dos níveis de desoxirribonucleotídeos que são importantes para a síntese de DNA, replicação da célula e reparo celular. Na AF essa ação pode ser útil pois auxilia na diminuição da contagem de leucócitos e da adesão vascular associada. Outras atividades farmacológicas associadas ao uso da HU, incluem um aumento da liberação de NO endotelial, diminuição da hemólise, redução da adesão intracelular e aumento do volume corpuscular médio (VMC) dos eritrócitos, que gera um aumento no intervalo de tempo entre a desoxigenação e a polimerização das hemácias, com consequente redução de vaso-oclusões (PICCIN *et al.*, 2018).

Outras terapias estão sendo usadas e/ou testadas para o tratamento da anemia falciforme. Essas terapias têm seus alvos farmacológicos baseados na fisiopatologia da doença, podendo atuar na modulação da polimerização da hemoglobina (ex: HU, metformina e senicapoc); na prevenção da vaso-oclusão (ex: HU, crizanlizumab e rivipansel) e na prevenção da disfunção endotelial (ex: HU, terapia oral ou intravenosa com nitrito, inalação de NO, arginina e L-glutamina) (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

É importante que desde o nascimento da criança sejam tomadas todas as providências para um bom prognóstico da doença. Isso inclui estar em dia com o esquema vacinal, especialmente para a vacina pneumocócica. Ademais, a administração de antibióticos profiláticos como a penicilina em doses diárias, até os seis anos de idade, tem reduzido a mortalidade infantil. Uma detecção precoce dos sinais e sintomas do paciente é fundamental para um manejo terapêutico adequado para aquele indivíduo (ZÚÑIGA *et al.*, 2018).

A HU impacta diretamente o perfil inflamatório dos pacientes com AF e está relacionada à indução da diminuição de citocinas pró-inflamatórias (ZAHARAN *et al.* 2020), como o IFN- $\gamma$ . Estudos mostram que o fármaco está relacionado com a diminuição dessa citocina, tendo como consequência uma melhora nos sintomas da doença (MAHMOUD *et al.*, 2020; ELALFY *et al.*, 2018). Entretanto, mais estudos são necessários para consolidar essa relação.

Desse modo, a educação em saúde é fundamental para garantia da adesão terapêutica visando conter temporariamente as complicações, reduzir a mortalidade e

aumentar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos pela doença (ZÚÑIGA *et al.*, 2018).

### 2.3 Interleucina 18 (IL-18) e anemia falciforme

A interleucina 18 (IL-18) foi primeiramente descrita no ano de 1989 como uma citocina capaz de induzir interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (NAKAMURA *et al.*, 1989). Entretanto, essa indução ocorre através de sinergia com a IL-12, onde a citocina atua nas linfócitos Th1, macrófagos, células NK, células B e células dendríticas para a produção do IFN- $\gamma$ , enquanto cada citocina sozinha tem muito menos potencial para fazer isso (YOSHIMOTO *et al.*, 1997; DINARELLO *et al.*, 1998). Essa sinergia ocorre pois a IL-12 aumenta a expressão do receptor IL-18R em células Th1 (IHIM *et al.* 2022).

Além disso, ausência de IL-12 e na presença de IL-2, a IL-18, ao se ligar ao seu receptor, aciona o adaptador MyD88 (fator de diferenciação primária mieloide 88) e dispara a via do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Simultaneamente, o sinal de IL-2 promove a fosforilação e ativação de STAT5. No núcleo, STAT5 e NF- $\kappa$ B se combinam nos mesmos reguladores gênicos dos *loci* de IL4, IL5 e IL13, gerando uma produção cooperativa e aumentada dessas citocinas de perfil Th2 (NAKANISHI, 2018).

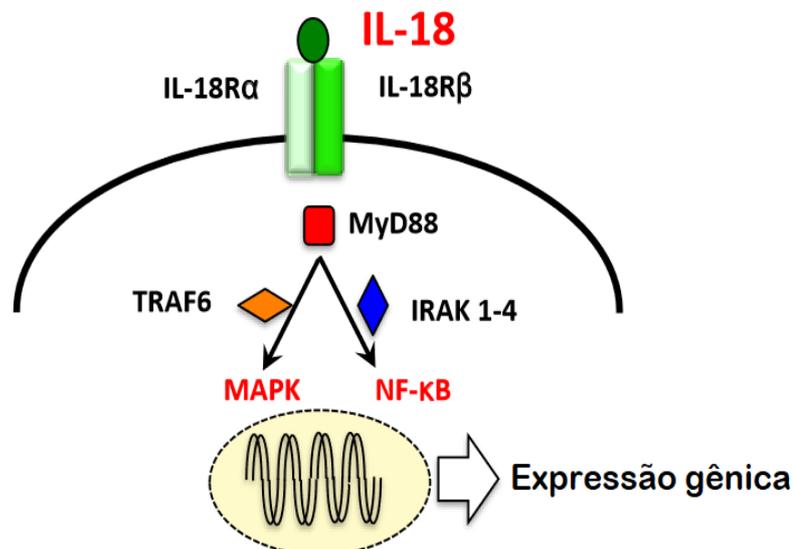
É uma citocina de baixo peso molecular (18kDa), pertencente à família da IL-1 e classificada como sendo do tipo pró-inflamatória, pois, ao induzir fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , quimiocinas CXC e CC, bem como o NF- $\kappa$ B, contribui para o processo inflamatório local e sistêmico (DINARELLO *et al.*, 1998). Outras atividades biológicas da IL-18 incluem a regulação da atividade citotóxica das células *Natural Killers* (NK), células da linhagem mielocítica e células T. Ademais, junto com a IL-3, consegue induzir mastócitos e basófilos a produção de IL-4 e IL-13. Sendo assim, a IL-18 participa tanto dos processos de indução da imunidade inata, como da imunidade adquirida (YASUDA; NAKANISHI; TSUTSUI, 2019; OKAMURA *et al.*, 1995).

A cadeia proteica humana da IL-18 consiste na associação de 193 aminoácidos. Sua síntese se dá a partir de um precursor inativo, denominado pró-IL-18 (24kDa), expressa em células endoteliais, queratinócitos, células do epitélio intestinal, células de Kupffer, fibroblastos e osteoblastos. Para se tornar ativa, a molécula sofre clivagem por meio da ação da enzima caspase 1 no inflamassoma

NLRP3. Após essa clivagem, a IL-18 madura é secretada pelos monócitos e macrófagos (FANTUZZI; REED; DINARELLO, 1999).

O receptor da IL-18 (IL-18R) é formado por duas subunidades: um componente induzível (IL-18R $\alpha$ ) e um componente constitutivamente expresso (IL-18R $\beta$ ). Ambos compartilham um domínio comum (também compartilhado por outros membros da família IL-1R) denominado domínio *Toll-like receptor* (TLR)/IL-1R (TIR). Após a ligação da IL-18 ao seu receptor, a subunidade IL-18R $\alpha$  forma um complexo de alta afinidade com a IL-18R $\beta$  que gera um sinal de transdução intracelular. O domínio TIR citoplasmático então, interage com o domínio TIR do fator de diferenciação primária mieloide 88 (MyD88), formando um complexo TIR-TIR. A fosforilação dessa molécula leva à ativação de TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), além de outras citocinas pró-inflamatórias (ADACHI *et al.*, 1998; YASUDA; NAKANISHI; TSUTSUI, 2019). A figura 10 mostra a ligação da IL-18 ao seu receptor e a cascata de eventos que ocorre após essa ligação.

**Figura 10:** Ligação da Interleucina 18 (IL-18).



Legenda: Ao ligar-se no seu receptor, a IL-18 medeia a formação de segundos mensageiros que culminam na expressão de genes capazes de induzir a produção de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , NO, entre outras, a partir de uma variedade de células humanas.

IL-18: Interleucina 18; IL-18R $\alpha$ : Receptor de interleucina 18 alfa; IL-18R $\beta$ : Receptor de interleucina 18 beta; NF- $\kappa$ B: fator nuclear  $\kappa$ B; MyD88: fator de diferenciação primária mieloide 88; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; IRAK-1: receptor interleucina-1 kinase 1 associada; IRAK-4: receptor interleucina-1 kinase 4 associada; TRAF6: receptor de fator de necrose tumoral associado ao fator 6.

Fonte: YASUDA; NAKANISHI; TSUTSUI (2019).

A IL-18, portanto, pode ser considerada como um biomarcador inflamatório (ZHABYEYEV; OUDIT, 2021) e níveis elevados de dessa citocina têm sido relacionados à patogênese de vários distúrbios e doenças, dentre as quais pode-se citar: infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca, síndrome dos ovários policísticos, doença renal crônica, doença pulmonar obstrutiva crônica, hepatite autoimune, sepse, anemia falciforme, dentre outras (DIAS-MELICIO *et al.*, 2015).

Embora nas últimas décadas o prognóstico dos pacientes com a doença falciforme tenha melhorado, eles ainda sofrem com uma baixa expectativa de vida (na faixa de 40 anos em média). Estudos apontam que as causas de morte mais comuns nesses indivíduos são síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar e morte súbita. A morte súbita está relacionada a arritmias que levam o indivíduo a morte cardíaca repentina (HAMIDEH; ALVAREZ, 2013).

Gupta e colaboradores (2021) realizaram um estudo sobre a associação dos níveis de IL-18 e o desenvolvimento de cardiomiopatias em pacientes com doença falciforme (incluindo pacientes HbSS) e modelo animal de camundongos com doença falciforme. O objetivo dos autores era identificar se a IL-18 medeia o desenvolvimento de cardiomiopatias e taquicardia ventricular. Seus achados mostraram resultados importantes acerca da temática: O quadro 2 mostra um compilado dos principais resultados obtidos no estudo.

**Quadro 2:** Relação do aumento da Interleucina 18 (IL-18) no desenvolvimento de cardiomiopatias na doença falciforme (DF).

Modelo murino de DF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Níveis circulantes mais altos de IL-18;</li> <li>• Aumento da fibrose cardíaca;</li> <li>• Aumento da duração prolongada do potencial de ação;</li> <li>• Maior indutibilidade de taquicardia ventricular;</li> <li>• Maior fosforilação cardíaca de NF-κB;</li> <li>• Redução da expressão do canal de potássio voltagem-dependente.</li> </ul>
---------------------	---

Modelo murino de DF com inibição sustentada de IL-18	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuição da fibrose cardíaca;</li> <li>• Diminuição da fosforilação de NF-κB;</li> <li>• Função diastólica melhorada;</li> <li>• Remodelação elétrica normalizada;</li> <li>• Taquicardia ventricular mediada por IL-18 atenuada.</li> </ul>
Pacientes com DF associada a fibrose miocárdica ou aumento do QTc	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apresentaram maior expressão do gene IL-18 nas células mononucleares do sangue periférico;</li> <li>• QTc foi fortemente correlacionado com os níveis plasmáticos de IL-18;</li> <li>• Risco significativamente aumentado (<math>p=0,017</math>) de morte em pacientes com níveis mais altos de IL-18 comparados com aqueles que tinham níveis mais baixos.</li> </ul>

Legenda: DF: Doença Falciforme; IL-18: Interleucina 18; NF-κB: fator nuclear kappa B; QTc: QT corrigido. No eletrocardiograma, QT é uma medida que representa o tempo total da despolarização (contração) e repolarização (relaxamento) ventricular. Fonte: Adaptado de: GUPTA *et al.* (2021)

Um outro estudo envolvendo a associação da IL-18 com a anemia falciforme foi desenvolvido por Duarte e colaboradores (2016). Seus estudos buscavam identificar genes relacionados com a função diastólica em pacientes com doença falciforme, pois tais disfunções são bem comuns nesses indivíduos e é considerado um fator de risco para aumento da mortalidade desses pacientes. A conclusão dos autores foi que o aumento da expressão gênica da IL-18 está associado à função diastólica e podem estar envolvidos com a sua patogenia (DUARTE *et al.*, 2016). Embora a disfunção diastólica na AF envolva múltiplos mecanismos fisiopatológicos complexos, um aumento de IL-18 sugere o envolvimento de processo inflamatório, que é crônico, seja como um mecanismo primário ou secundário devido ao estado hiperdinâmico (GBOTOSHO; GOLLAMUDI; HYACINTH, 2023).

Há grande evidência de que o processo inflamatório, característico na AF, seja bastante influenciado pelo heme liberado durante a hemólise. Isso porque, o

heme é capaz de ativar o inflamassoma NLRP3. A formação do inflamassoma NLRP3 inicia-se através de receptores de reconhecimento de padrões (PRR) que reconhecem padrões moleculares associados a danos. Uma vez formados, o NLRP3 promove a ativação da caspase-1, que cliva a citocina inflamatória pró-IL-18 para IL-18 (forma ativada) (SALGAR *et al.*, 2023). Pacientes com anemia falciforme apresentam sinalização elevada de inflamassoma, com aumento da expressão de mRNA de NLRP3, caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 (PITANGA *et al.*, 2016).

Ao comparar pacientes com AF que fazem uso da HU com aqueles que não são tratados com o fármaco, Pitanga *et al.* (2021) observaram que embora os pacientes tratados tenha uma redução da expressão dos genes do NLRP3, o tratamento não modula a expressão de outros componentes do inflamassoma.

Almeida (2017) avaliou se a presença de polimorfismo nos receptores dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e das interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-18 podiam ter relação com a severidade da AF. Seus ensaios mostraram que não houve relação entre o polimorfismo e a gravidade da doença.

Níveis de IL-18 se mostraram alteradas no estudo de Azevedo e sua equipe (2021). Os pesquisadores realizaram um ensaio envolvendo a terapia de transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas em 32 pacientes com anemia falciforme. Os participantes receberam as células-tronco e sua evolução foi observada durante um período de 5 anos. Eles observaram que os níveis da citocina permaneceram elevados naqueles pacientes que apresentaram falha no enxerto (rejeição), enquanto os níveis de IL-18 estavam reduzindo nos pacientes que não apresentaram rejeição do enxerto. Os autores associam a taxa de IL-18 a ativação do inflamassoma NLRP3.

As taxas de IL-18 mostraram-se aumentadas em pacientes durante as crises dolorosas, quando comparadas com pacientes em estado estacionário, sugerindo um envolvimento dessa citocina na exacerbação clínica (SIRANSY *et al.*, 2023); e mostraram-se reduzidas em pacientes com AF após receberam tratamento com baixas doses de mometasona por via inalatória, que resultou em diminuição da concentração de VCAM e dos episódios de crises dolorosas (LANGER *et al.*, 2019). Os dados dos estudos registram níveis aumentados de IL-18 na AF e reforçam seu papel nos processos inflamatórios, sobretudo pela indução de IFN- $\gamma$ .

## 2.4 Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e Anemia falciforme

Como previamente mencionado, o processo inflamatório envolvido na AF leva o indivíduo a diversas complicações da doença. A célula em foice é mais frágil e tem um tempo de meia-vida menor do que hemácias normais. Portanto, quando ocorre hemólise, é liberado heme e outras moléculas que aumentam o processo inflamatório, que vão atuar como padrões moleculares associados a danos (DAMP), causando ativação do sistema de coagulação, bem como do sistema imunológico inato (SIRANSY *et al.*, 2023). Pelo próprio processo fisiopatológico envolvido na anemia falciforme, diversas citocinas são liberadas, gerando inflamação no local (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

O IFN- $\gamma$  é uma das citocinas liberadas durante esse processo. É produzido principalmente por linfócitos T helper 1 (Th1), bem como em outros tipos celulares, incluindo os linfócitos CD8, células B, células NK, monócitos, macrófagos e células dendríticas. Algumas citocinas estimulam a produção de IFN- $\gamma$ , como a IL-18, vista anteriormente (BHAT *et al.*, 2018).

Um nível elevado de IFN- $\gamma$  causa danos teciduais em pacientes com doença falciforme e pode desempenhar um papel na patogênese da inflamação nesses indivíduos tanto em um estado estacionário (sem crises de dor) ou durante a crise. É o que concluiu um estudo conduzido por Khalifa e colaboradores (2018). Em sua pesquisa, os cientistas avaliaram o papel do IFN- $\gamma$  na patogenia da DF. Seus achados mostraram que os níveis de IFN- $\gamma$  foram significativamente maiores em pacientes com a doença comparado com indivíduos saudáveis.

Um outro estudo, avaliou a associação dos níveis de IFN- $\gamma$  com a anemia falciforme (HbSS) em crianças com crises de vaso-oclusão e em condições estáveis que faziam uso de HU, comparadas com crianças saudáveis. Os participantes passaram pelo processo de triagem e a coleta de sangue foi realizada a fim de fazer a dosagem dos níveis da citocina. Um aumento de IFN- $\gamma$  foi detectado no grupo com AF comparado com o grupo controle. Além disso, crianças com crises vaso-oclusivas apresentaram níveis de IFN- $\gamma$  maiores do que aquelas em condições estáveis. O estudo também mostrou que pacientes com uma baixa adesão ao tratamento com HU apresentaram níveis mais altos da citocina, enquanto os pacientes que tinham boa adesão à terapia, houve diminuição dos níveis séricos de IFN- $\gamma$ , evidenciando o papel

importante da hidroxireia no prognóstico da doença e na redução do processo inflamatório (MAHMOUD *et al.*, 2020).

Em contrapartida, um nível baixo de IFN- $\gamma$  pode comprometer o sistema imunológico, visto que a citocina apresenta um papel importante no reconhecimento de patógenos, apresentação de antígenos, inibição da proliferação celular e efeitos na apoptose, além de participar da ativação de células T e macrófagos e induzir a expressão de moléculas MHC de classe 1 (TIRON; VASILESCU, 2008).

Um dos órgãos responsáveis pela manutenção do sistema imune ativado é o baço. O baço apresenta importância na produção de células de defesa contra infecções, armazenando cerca de um quarto do total de linfócitos. Participa tanto do processo imunológico inato como adaptativo. Dentre outras funções, também é responsável pela produção de IFN- $\gamma$ . Em pacientes com anemia falciforme, a função esplênica pode ser reduzida, uma vez que a grande quantidade de hemólise gera sequestro esplênico, que acaba prejudicando o órgão. Com base nisso, Okongwu e colaboradores (2018) realizaram um estudo a fim de avaliar o nível de IFN- $\gamma$  em pacientes com AF com autoesplenectomia. Sua análise objetivou determinar se a autoesplenectomia afeta a imunidade de pacientes com AF, refletida pelos valores de IFN- $\gamma$ . Seus resultados mostraram que pacientes com AF associado com autoesplenectomia apresentaram mais crises de dor comparados aos pacientes com AF sem comprometimento do baço. Ademais, as taxas de infecções foram menores nos pacientes que não apresentaram autoesplenectomia. Os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  não apresentaram resultados significativos nesse estudo, ao se comparar os dois grupos estudados (OKONGWU *et al.*, 2018).

Outros estudos associando o IFN- $\gamma$  com a doença falciforme foram desenvolvidos. No estudo de Elalfy e colaboradores (2018), foi observado que os níveis de IFN- $\gamma$  eram mais baixos em pacientes em terapia com HU e mais elevados naqueles que possuíam histórico de CVO. Um outro estudo, coordenado por Silva-Junior e equipe (2021), também associou os níveis elevados de IFN- $\gamma$  aos pacientes com AF em CVO. Esses achados reforçam a importância das citocinas como potenciais biomarcadores de inflamação na AF (ELALFY *et al.*, 2018; SILVA-JUNIOR *et al.*, 2021), entretanto, mais investigações são necessárias para se compreender melhor os mecanismos imunológicos envolvidos nessa associação.

### 3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A anemia falciforme é uma hemoglobinopatia severa e seu prognóstico continua sendo desafiador para os pacientes portadores. Trata-se de uma doença crônica que apresenta como característica episódios de crises dolorosas que podem evoluir para danos permanentes em tecidos e órgãos. Desencadeia uma resposta inflamatória caracterizada pela liberação de diversas citocinas, entre elas a IL-18 e o IFN $\gamma$ . A IL-18 é um indutor de IFN $\gamma$  que, quando elevado, pode causar diversos danos teciduais resultando em piora do quadro dos pacientes portadores de anemia. Para o tratamento, a terapia medicamentosa se dá pelo uso de hidroxiureia, que por sua vez, está estreitamente relacionada com os níveis de citocinas mencionadas. A realização de estudos que visem uma melhor compreensão entre a relação dessas citocinas com o perfil de exames clínicos de portadores de anemia poderá ser útil para um melhor prognóstico e conscientização de pacientes portadores de anemia falciforme.

Estudos que investigam a correlação entre essas citocinas e os parâmetros clínicos de pacientes com anemia falciforme são escassos e, em sua maioria, limitados a um número reduzido de participantes (DUARTE *et al.*, 2016; AZEVEDO *et al.*, 2021; GUPTA *et al.*, 2021; SIRANSY *et al.*, 2023; ELALFY *et al.*, 2018; KHALIFA *et al.*, 2018; OKONGWU *et al.*, 2018; MAHMOUD *et al.*, 2020; SILVA-JUNIOR *et al.*, 2021). Assim, esse trabalho visa compreender a relação entre a IL-18 e a sua influência sobre os parâmetros hematológicos e achados clínicos em pacientes com anemia falciforme, bem como sua influência sobre os níveis de HbF. Além disso, é importante se entender melhor a ação das citocinas, avaliar a relação de aumento ou diminuição desses marcadores e associar com o uso ou não da terapia medicamentosa prescrita. Essa é uma pesquisa inédita no contexto regional com interface inflamatória envolvendo as citocinas a IL-18 e INF- $\gamma$ , além da HbF.

A Secretaria da Saúde do Estado do Ceará informou em 2022 que o HEMOCE (Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará) atende cerca de 400 pacientes adultos com DF (SESA, 2022). Levando em consideração esse número, a inclusão de 85 participantes com a doença neste estudo representa aproximadamente 20% da população atendida pela Instituição. Essa proporção reforça o caráter representativo da amostra e confere robustez aos dados obtidos, sobretudo em um cenário em que a obtenção de amostras clínicas de pacientes com AF ainda representa um desafio logístico e ético.

Outro ponto importante é que a pesquisa foi realizada em em Fortaleza, cidade no Ceará com alta prevalência de casos diagnosticados de AF. Considerando a elevada incidência dessa doença no Brasil, os avanços no entendimento de fatores associados a gravidade da doença e sua apresentação clínica, podem gerar impactos positivos no atendimento aos pacientes portadores.

Portanto, é crucial que haja uma preocupação com o entendimento da patofisiologia inflamatória da doença e dos seus processos inflamatórios, a fim de assegurar que os indivíduos acometidos façam adesão ao tratamento, para evitar complicações, diminuir a taxa de mortalidade e melhorar a qualidade de vida dos seus portadores (ZÚÑIGA *et al.*, 2018).

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar a influência dos níveis de Interleucina 18 (IL-18) e o Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) nos parâmetros hematológicos e níveis de Hemoglobina Fetal (HbF) em pacientes portadores de anemia falciforme atendidos em um hemocentro na cidade de Fortaleza, Ceará.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar, de maneira associada, o perfil demográfico e laboratorial de pacientes com anemia falciforme;
- Avaliar os parâmetros hematológicos entre os grupos de acordo com o uso de HU;
- Correlacionar, de maneira associada, os níveis de HbF e parâmetros hematológicos de acordo com o uso de HU;
- Avaliar os níveis das citocinas IL-18 e IFN- $\gamma$  em pacientes com AF, de acordo com o uso de HU;
- Avaliar a correlação e influência das citocinas IL-18 e IFN- $\gamma$  com os parâmetros hematológicos de pacientes com AF de acordo com o uso de HU;

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1 Aspectos Éticos**

O estudo científico foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), situado na Avenida José Bastos, 3390, bairro Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará, sob registro de número 2.979.26 (Anexo 1). Este projeto foi avaliado e considerado aprovado por atender aos princípios éticos e à legislação vigente à pesquisa em humanos no Brasil. A pesquisa seguiu os princípios éticos estabelecidos pela resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

### **5.2 Tipo de estudo**

O estudo foi do tipo transversal, observacional, descritivo e analítico que visou avaliar a relação entre os níveis de Interleucina 18 (IL-18) e Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) com parâmetros hematológicos de pacientes portadores de anemia falciforme atendidos em um hemocentro da cidade de Fortaleza, CE.

### **5.3 Local do estudo**

A coleta dos dados foi realizada no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), no período entre julho de 2021 à maio de 2022. Fundado em 1983, o HEMOCE é hoje responsável pela realização de atendimento a pacientes e doadores e atua com excelência e inovação em hemoterapia, hematologia e transplantes, bem como suporte ao sistema de saúde (HEMOCE, 2022).

A análise das amostras foi feita no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) do Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará (UFC) em parceria com o Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHGDH) e com Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica da UFC.

#### 5.4 População de estudo

Ao todo, participaram do estudo 116 voluntários, sendo estratificados em três grupos: Grupo 1 (G1) – em terapia com HU (n= 73); Grupo 2 (G2) – sem terapia com HU (n= 12) e Grupo 3 (G3) – Controle (n=31). Todos os integrantes foram recrutados do HEMOCE. Os membros dos grupos 1 e 2 foram pacientes em acompanhamento de AF atendidos pelo ambulatório de hemoglobinopatias do HEMOCE. Já os integrantes do grupo 3, foram pessoas saudáveis que compareceram ao hemocentro para doação de sangue.

#### 5.5 Critérios de inclusão e exclusão

Participaram dos grupos 1 e 2 indivíduos adultos (com idade superior a 18 anos), de ambos os sexos, diagnosticados com anemia falciforme (HbSS), confirmados a partir de eletroforese de hemoglobina e/ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Outro critério inclusivo era estar em acompanhamento no HEMOCE e concordar em participar da pesquisa, através da leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice 1). Após assinatura do termo, estes se apresentaram para a coleta do material biológico para que fossem realizados exames de rotina para acompanhamento da evolução da doença no ambulatório de hemoglobinopatias. Além disso, somente foram incluídos, àqueles que se encontravam em estado estacionário, de acordo com os critérios de Ballas (2011).

Segundo Ballas (2011), o estado estacionário é um ponto no tempo em que o paciente em não está passando por uma crise de dor aguda. Alguns critérios devem ser atendidos para se estabelecer um estado estacionário:

1. Ausência de episódio de dor aguda que requeresse atendimento em pronto-socorro ou hospitalar por pelo menos quatro semanas consecutivas após crise dolorosa anterior;
2. Sem história de internação em hospital ou pronto-socorro 2 a 3 dias após o momento em questão;
3. Sem história de transfusão de sangue durante os 4 meses anteriores ao momento;
4. Sem história de doença intercorrente, como infecção, inflamação durante as 4 semanas anteriores;

5. Nenhum tratamento com medicamentos, como antibióticos, que possam afetar as contagens sanguíneas durante as 3 semanas anteriores;
6. Os valores de estado estacionário podem mudar com o tempo. É, portanto, aconselhável determiná-los periodicamente a cada 2-3 anos.

Foram excluídos pessoas em estado gestacional, pessoas que apresentavam outras doenças hematológicas associadas, indivíduos politransfundidos e indivíduos com genótipo heterozigoto para AF (traço falcêmico).

Para os integrantes do grupo controle, foram designados adultos saudáveis que compareceram ao local do estudo para doação voluntária de sangue e que concordaram em participar do ensaio a partir da assinatura do TCLE.

## **5.6 Coleta de dados e amostra**

Os indivíduos dos grupos 1, 2 e 3 que se enquadravam nos critérios de inclusão e que assinaram o TCLE, receberam instruções a respeito do delineamento do estudo. Os dados foram coletados a partir de amostra de sangue periférico e de prontuários médicos.

### **5.6.1 Coleta das amostras biológicas**

A coleta do sangue periférico dos participantes da pesquisa foi feita no ambulatório de hemoglobinopatias do HEMOCE, por profissionais qualificados, seguindo as normas de utilização de materiais perfurocortantes, entre o período de julho de 2021 a maio de 2022. O sangue foi coletado em tubos *vacutainer*® contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) como anticoagulante e armazenados em freezer até o momento da análise.

### **5.6.2 Informações clínicas, laboratoriais e demográficas**

As informações clínicas e laboratoriais foram obtidas a partir dos prontuários, presentes no ambulatório do HEMOCE. Os dados coletados dos pacientes estão dispostos no quadro a seguir.

**Quadro 3:** Coleta de dados dos prontuários dos pacientes com AF.

Dados demográficos	Idade e sexo
Dados antropométricos	Peso e altura
Dados clínicos	Uso de HU e frequência de crises dolorosas
Dados laboratoriais	Hemograma (leucócitos, neutrófilos, hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, CHCM, RDW, plaquetas, NLR e PLR) e % de Hb (HbS, HbA2 e HbF)

Legenda: VCM: volume celular médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média; RDW: Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos; NLR: Relação Neutrófilo-Linfócito; PLR: Relação Plaquetas-linfócitos.

Hb: Hemoglobina.

### 5.7 Análise das citocinas: IL-18 e IFN $\gamma$

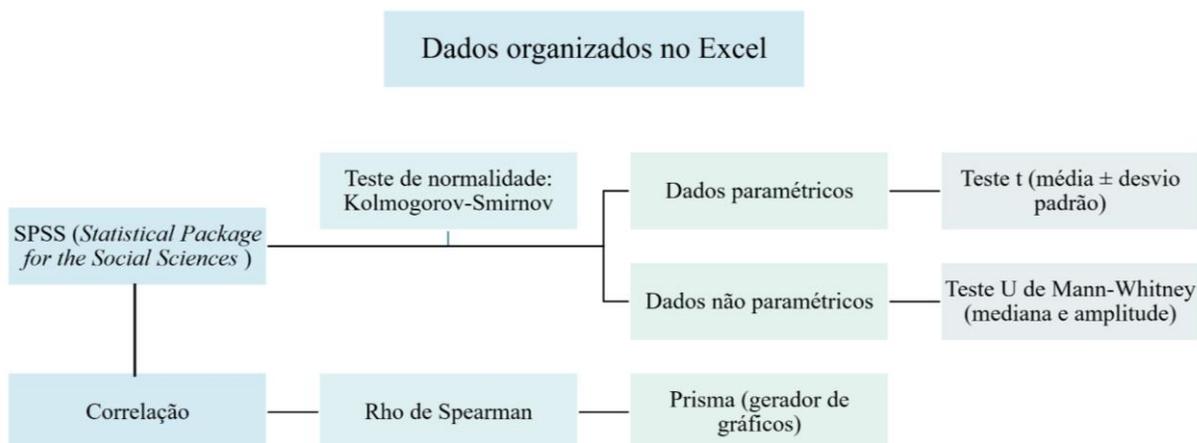
O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) foi utilizado a fim de determinar os níveis séricos de IFN- $\gamma$ , fazendo o uso do kit de ELISA (cat. n. KHC4021; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc). Os níveis séricos de IL-18 também foram determinados a partir de ELISA (ab215539, Abcam). O procedimento de ambos seguiu as normas dos fabricantes, e as leituras colorimétricas foram feitas utilizando espectrofotômetro com comprimento de onda de 450nm.

### 5.8 Análise estatística

Os valores obtidos de cada parâmetro foram dispostos em tabelas por meio do software Excel versão 2016 para posterior análise estatística. Com o objetivo de descrever as variáveis quantitativas, utilizou-se a média e o desvio-padrão quando estas apresentaram distribuição normal, enquanto a mediana e a amplitude foram utilizados quando não apresentaram distribuição normal. As variáveis categóricas foram representadas por frequências simples e porcentagens. A fim de avaliar se os dados possuíam distribuição normal, aplicaram-se os testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Todos os dados dos pacientes foram inseridos no banco de dados do software IBM - *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), em sua versão 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), e analisados utilizando-se o mesmo pacote

estatístico. O teste t de Student foi usado quando os dados apresentaram distribuição normal e o teste U de Mann-Whitney foi usado para dados de distribuição não paramétrica. A correlação entre as variáveis foi verificada através do teste estatístico de Rho de Spearman. Os gráficos foram gerados no programa estatístico *Graph Pad Prism 6*. O nível de significância estatística utilizado foi de  $p < 0,05$ . A figura 11 abaixo ilustra a estatística do estudo.

**Figura 11:** Desenho esquemático do delineamento do estudo.



Fonte: Própria.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Análise dos dados demográficos e clínicos

Dos 85 pacientes com AF, 73 (85,9%) seguiam a terapia medicamentosa com HU (grupo 1) e 12 (14,1%) não faziam uso do medicamento (grupo 2). Dentre os participantes do grupo 1, 54,8% (n=40) eram do sexo feminino, com idade entre 18 e 64 anos; e 45,2% (n=33) eram do sexo masculino, com idade entre 19 e 74 anos; e dentre os participantes do grupo 2, 58,3% eram do sexo feminino, com idade entre 19 a 53 anos; e 41,7% eram do sexo masculino, com idade entre 18 a 47 anos. A média da idade dos participantes do grupo 1 foi de 33,22 anos (DP±12,48) e a do grupo 2 foi de 28,67 anos (DP± 10,65). Dentre os 31 integrantes do grupo 3 (Controle), 51,6% (n=16) eram do sexo feminino, com idade entre 19 e 54 anos e 48,4% (n=15) eram do sexo masculino, com idade entre 19 e 72 anos. A média da idade dos participantes do grupo controle foi de 33,5 anos (DP±12,86). O peso médio dos participantes do grupo 1 foi de 57,44kg (DP± 11,39), do grupo 2 foi de 54,25kg (DP± 5,66) e do GC foi de 74,2kg (DP±13,46). Já em relação à variável altura, os pacientes do grupo 1 tiveram média de 1,61m (DP±0,099), do grupo 2 tiveram média de 1,64m (DP± 0,080) e os participantes do GC tiveram média de 1,67 (DP±0,109). Os dados demográficos acima descritos são mostrados na tabela 1.

**Tabela 1.** Dados demográficos dos participantes do estudo.

	<b>Sexo (%)</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>Altura (m)</b>
<b>Anemia falciforme Em terapia com HU</b>	Fem.: 54,8	M= 33,22	M= 57,44	M= 1,61
		A= 18-74	A= 40-90	A= 1,38-1,87
	Masc.: 45,2	DP± 12,48	DP± 11,39	DP± 0,099
	<b>Total: 73 participantes</b>			
<b>Anemia falciforme Sem terapia com HU</b>	Fem.: 58,3	M= 28,67	M= 54,25	M= 1,64
		A= 18-53	A= 44-65	A= 1,50-1,80
	Masc.: 41,7	DP± 10,65	DP± 5,66	DP± 0,080
	<b>Total: 12 participantes</b>			

	Fem.: 51,6	M= 33,5	M= 74,2	M= 1,67
		A= 19-72	A= 52-109	A= 1,50-1,93
<b>Controle</b>	Masc.: 48,4	DP± 12,86	DP± 13,46	DP± 0,109
<b>Total: 31 participantes</b>				

Legenda: Fem.: feminino; Masc.: masculino; M: média; A: amplitude; DP: Desvio padrão.

A maior parte dos pacientes que faziam uso do fármaco, utilizavam há mais de quatro anos (65,88%; n=56). Outro critério avaliado foi a ausência e presença de crises dolorosas no último ano e a frequência de aparecimento dessas dores, onde 37 pessoas (43,5%) afirmaram ter apresentado as crises, das quais 10 delas relataram ter tido mais de 3 crises de dor no último ano. Adicionalmente, 27 pacientes afirmaram ter tido menos que 3. Dos 73 pacientes que seguem a terapia medicamentosa com HU, 32 (43,8%) apresentaram crises dolorosas, enquanto 41 (56,2%) não apresentaram essas crises. Dos 12 indivíduos que não faziam uso do fármaco, 5 (41,7%) apresentaram crises de dor e em 7 (58,3%) pacientes a crise foi ausente. A tabela 2, é uma tabela descritiva que mostra a distribuição das crises de dor entre os pacientes com AF.

**Tabela 2:** Frequência de crises de dor em pacientes com anemia falciforme.

<b>Crises dolorosas</b>	<b>Usuários de HU</b>		<b>Não usuários de HU</b>	
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Sem crise no último ano</b>	41	56,2%	7	58,3%
<b>Menos de 3 crises</b>	23	31,5%	4	33,3%
<b>Mais de 3 crises</b>	9	12,3%	1	8,3%
<b>Total</b>	73	100%	12	100%

Legenda: HU: Hidroxiuréia.

## 6.2 Parâmetros laboratoriais

Os parâmetros laboratoriais foram avaliados entre os grupos. A tabela 3 mostra essa comparação entre os participantes do grupo com AF e os participantes

do grupo controle. Os seguintes parâmetros apresentaram diferença, quando compararam-se as variáveis do grupo AF e controle: contagem de leucócitos ( $t(71,55) = 2,790$ ;  $p=0,007$ ), hemácias ( $t(114) = -20,621$ ;  $p=0,001$ ), hemoglobina ( $t(114) = -14,66$ ;  $p=0,001$ ), hematócrito ( $t(114) = -15,549$ ;  $p=0,0015$ ), VCM ( $t(111,505) = 11,006$ ;  $p=0,001$ ), HCM ( $t(113,084) = 10,985$ ;  $p=0,001$ ), CHCM ( $t(90,948) = 2,631$ ;  $p= 0,010$ ), plaquetas ( $t(87,379) = 4,749$ ;  $p=0,001$ ) e NLR ( $t(112) = -3,316$ ;  $p=0,001$ ); o teste U de Mann-Whitney mostrou também que o RDW (Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos) foi maior no grupo AF quando comparado ao grupo controle.

**Tabela 3.** Avaliação dos parâmetros laboratoriais entre os grupo teste (com anemia falciforme) e o grupo controle.

Parâmetros laboratoriais	Grupos de estudo		p
	AF	GC	
Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	8.370,61 ( $\pm 3.136,25$ ) <sup>1</sup>	6.865,81 ( $\pm 2.330,80$ ) <sup>1</sup>	0,007*
Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	3.555,00 (800,00-12.460,00) <sup>2</sup>	4.065,00 (1370,00-8070,00) <sup>2</sup>	0,406
Hemácias (/mm <sup>3</sup> )	2.330.470,59 ( $\pm 516.611,92$ ) <sup>1</sup>	4.482.903,23 ( $\pm 439.478,43$ ) <sup>1</sup>	0,001*
Hemoglobina (g/dL)	8,86 ( $\pm 1,73$ ) <sup>1</sup>	13,86 ( $\pm 1,31$ ) <sup>1</sup>	0,001*
Hematócrito (%)	24,57 ( $\pm 4,72$ ) <sup>1</sup>	39,03 ( $\pm 3,50$ ) <sup>1</sup>	0,001*
VCM (fL)	107,12 ( $\pm 14,95$ ) <sup>1</sup>	87,20 ( $\pm 4,48$ ) <sup>1</sup>	0,001*
HCM (pg)	38,66 ( $\pm 5,71$ ) <sup>1</sup>	30,95 ( $\pm 1,85$ ) <sup>1</sup>	0,001*
CHCM (g/dL)	36,07 ( $\pm 1,45$ ) <sup>1</sup>	35,50 ( $\pm 0,85$ ) <sup>1</sup>	0,010*
RDW (%)	19,70 (14,20- 41,90) <sup>2</sup>	12,90 (11,40- 15,30) <sup>2</sup>	0,001*
Plaquetas ( $\times 10^3$ )	327,15 ( $\pm 130,51$ ) <sup>1</sup>	231,48 ( $\pm 79,80$ ) <sup>1</sup>	0,001*
NLR	1,05 ( $\pm 0,66$ ) <sup>1</sup>	1,51 ( $\pm 0,60$ ) <sup>1</sup>	0,001*

PLR	85,77 ( $\pm 50,44$ ) <sup>1</sup>	93,18 ( $\pm 27,72$ ) <sup>1</sup>	0,454
-----	------------------------------------	------------------------------------	-------

Legenda: AF: Anemia falciforme; GC: Grupo controle; VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média; RDW: Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos; NLR: Relação Neutrófilo-Linfócito; PLR: Relação Plaquetas-linfócitos. O teste t de Student foi usado para comparar 2 amostras com distribuição normal e o teste U de Mann-Whitney foi usado para dados com distribuição não normal. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. <sup>1</sup>: Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (dados paramétricos).

<sup>2</sup>: Dados expressos em mediana e amplitude (dados não paramétricos). \*Valores significativos

A tabela 4, mostra a comparação das alterações em exames laboratoriais entre os pacientes com anemia falciforme, considerando se o indivíduo faz ou não uso do fármaco hidroxiureia. Com relação aos parâmetros VCM ( $t(83) = 4,428$ ;  $p=0,001$ ) e HCM ( $t(83) = 4,322$ ;  $p=0,001$ ), foi observado que o grupo com uso de HU apresentou diferença, com valores mais altos, quando comparado ao grupo que não faz uso do fármaco. Os outros parâmetros, entretanto, não apresentaram diferença.

**Tabela 4.** Avaliação de parâmetros laboratoriais de acordo com o uso de Hidroxiuréia.

Parâmetros laboratoriais	Uso de Hidroxiuréia		p
	Sim	Não	
Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	8210,23 ( $\pm 3223,56$ ) <sup>1</sup>	9346,33 ( $\pm 2426,19$ ) <sup>1</sup>	0,247
Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	3520,00 (848,00-12460,00) <sup>2</sup>	4291,00 (2800,00-9180,00) <sup>2</sup>	0,177
Hemácias (/mm <sup>3</sup> )	2288219,18 ( $\pm 435026,64$ ) <sup>1</sup>	2587500,00 ( $\pm 845825,31$ ) <sup>1</sup>	0,253
Hemoglobina (g/dL)	8,98 ( $\pm 1,71$ ) <sup>1</sup>	8,07 ( $\pm 1,65$ ) <sup>1</sup>	0,088
Hematócrito (%)	24,88 ( $\pm 4,63$ ) <sup>1</sup>	22,74 ( $\pm 5,062$ ) <sup>1</sup>	0,148
VCM (fL)	109,75 ( $\pm 13,70$ ) <sup>1</sup>	91,10 ( $\pm 12,32$ ) <sup>1</sup>	0,001*
HCM (pg)	39,65 ( $\pm 5,16$ ) <sup>1</sup>	32,67 ( $\pm 5,32$ ) <sup>1</sup>	0,001*
CHCM (g/dL)	36,12 ( $\pm 1,36$ ) <sup>1</sup>	35,77 ( $\pm 1,98$ ) <sup>1</sup>	0,436
RDW (%)	19,70 (14,20- 41,90) <sup>2</sup>	20,15 (14,30- 33,60) <sup>2</sup>	0,549

Plaquetas ( $\times 10^3$ )	316,31 ( $\pm 118,73$ ) <sup>1</sup>	393,06 ( $\pm 179,65$ ) <sup>1</sup>	0,059
Reticulócitos ( $\times 10^3$ )	225,04 ( $\pm 772,64$ ) <sup>1</sup>	228,02 ( $\pm 795,97$ ) <sup>1</sup>	0,910
Hemoglobina S (%)	76,40 (37,70- 93,70) <sup>2</sup>	83,50 (23,60- 90,20) <sup>2</sup>	0,863
Hemoglobina A2 (%)	4,50 (1,10- 6,00) <sup>2</sup>	4,70 (2,80-7,80) <sup>2</sup>	0,560
Hemoglobina F (%)	14,22 ( $\pm 7,70$ ) <sup>1</sup>	10,02 ( $\pm 7,35$ ) <sup>1</sup>	0,096

Legenda: VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média; RDW: Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos; NLR: Relação Neutrófilo-Linfócito; PLR: Relação Plaquetas-lyfócitos. O teste t de Student foi usado para comparar 2 amostras com distribuição normal e o teste U de Mann-Whitney foi usado para dados com distribuição não normal. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. <sup>1</sup>: Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (dados paramétricos). <sup>2</sup>: Dados expressos em mediana e amplitude (dados não paramétricos). \*Valores significativos.

Considerando que a HU é um medicamento cujo mecanismo de ação envolve o aumento dos níveis de HbF, procedeu-se à análise da relação entre essa variável e os outros parâmetros laboratoriais previamente avaliados. Essa correlação foi examinada exclusivamente dentro do conjunto de pacientes com AF. A tabela 5 mostra essa correlação entre os pacientes com AF em uso ou não de HU. É possível inferir que os leucócitos ( $\rho = -0,489$ ;  $p = 0,001$ ), neutrófilos ( $\rho = -0,483$ ;  $p = 0,001$ ), plaquetas ( $\rho = -0,282$ ;  $p = 0,024$ ) e reticulócitos ( $\rho = -0,325$ ;  $p = 0,011$ ) apresentam correlação negativa com a HbF e que a hemoglobina ( $\rho = 0,350$ ;  $p = 0,005$ ) apresenta correlação positiva com o HbF. A correlação não foi observada nos pacientes que não seguem a terapia com o medicamento. A figura 12 ilustra a correlação entre as variáveis com resultado significativo.

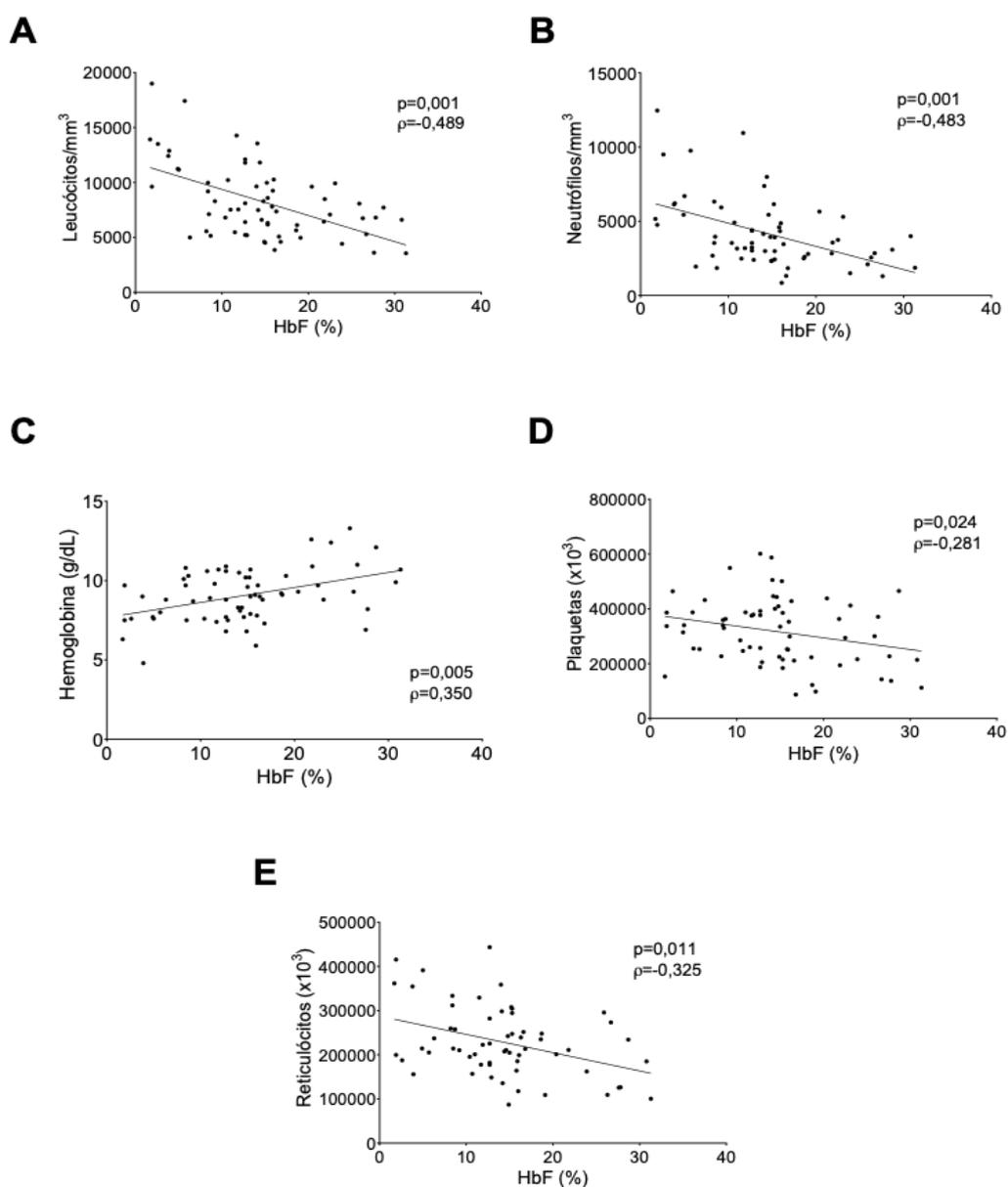
**Tabela 5:** Correlação da HbF entre os pacientes com AF em uso de HU e a correlação entre a HbF entre os pacientes com AF que não seguem a terapia com HU.

Parâmetros laboratoriais	HbF			
	Uso de Hidroxiuréia			
	Sim		Não	
	Rho	<i>p</i>	Rho	<i>p</i>
Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	-0,489	0,001*	-0,132	0,699

Neutr3filos (/mm <sup>3</sup> )	-0,483	0,001*	-0,091	0,790
Hemoglobina (g/dL)	0,350	0,005*	-0,241	0,474
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> )	-0,282	0,024*	-0,409	0,212
Reticul3citos (x10 <sup>3</sup> )	-0,325	0,011*	-0,283	0,460

Legenda: HbF: Hemoglobina fetal.

**Figura 12:** Correla3o3o entre os n3veis de HbF com os leuc3citos (A), neutr3filos (B), hemoglobina (C), plaquetas (D) e reticul3citos (E).



### 6.3 Dosagem sérica de IL-18 e IFN- $\gamma$

A dosagem das citocinas IL-18 e IFN- $\gamma$  foi realizada a partir do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Foi realizada uma comparação dessas citocinas entre os grupos AF e o grupo controle (Tabela 6 e figura 13). Os níveis de IL-18 e IFN- $\gamma$  no grupo AF foram mais altos em comparação com o grupo controle ( $p < 0,001$ ).

Na tabela, também é apresentada a relação dos pacientes com anemia falciforme em uso ou não da terapia com hidroxiureia e a dosagem de IL-18 e IFN- $\gamma$ . A tabela demonstrou que não foi observada diferença quanto aos níveis das citocinas analisadas ( $p > 0,05$ ).

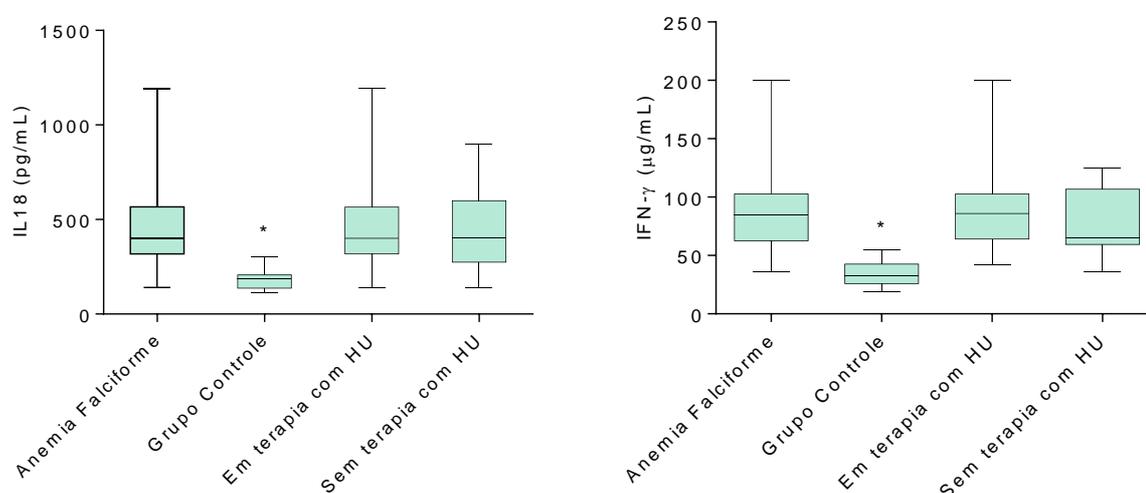
**Tabela 6.** Relação dos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-18 entre os grupos teste (com anemia falciforme), em uso ou não da terapia com hidroxiureia e grupo controle.

	<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>Amplitude</b>	<b>p</b>
<b>IL-18</b>	AF	85	344.1	141.03-1191.8	0.001*
	Controle	31	189.36	114.15-300.35	
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	AF	85	85.00	36.00-200.00	0.001*
	Controle	31	33.00	19.00-55.00	
<b>IL-18</b>	Em terapia com HU	73	415.97	141.03-5420.49	0.649
	Sem terapia com HU	12	401.72	141.03-896.38	
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Em terapia com HU	73	86.00	42.00- 200.00	0.245

Sem terapia	12	65.50	36.00- 125.00
com HU			

Legenda: IL-18: Interleucina 18; INF- $\gamma$ : Interferon gama. O teste teste U de Mann-Whitney foi usado para comparação dos dados com distribuição não paramétrica. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. \*Valores significativos.

**Figura 13.** Mediana de IL-18 (a) e INF- $\gamma$  (b) dos pacientes *versus* controle.



Ao considerar todos os participantes com AF (com uso ou não de HU), a IL-18 esteve correlacionada com níveis aumentados de leucócitos ( $\rho= 0,260$ ;  $p= 0,018$ ), neutrófilos ( $\rho= 0,260$ ;  $p= 0,018$ ), HbS ( $\rho= 0,327$ ;  $p= 0,004$ ) e HbF ( $\rho= -0,244$ ;  $p= 0,037$ ). Além disso, a correlação entre a IL-18 e o HbF é uma correlação inversamente proporcional. Níveis aumentados de INF- $\gamma$  não estiveram associados aos parâmetros dos exames laboratoriais (tabela 7 e figura 14).

Ainda na tabela 7 também é apresentado a relação entre os níveis das citocinas com os parâmetros laboratoriais de pacientes em uso da terapia medicamentosa. A tabela mostrou que há correlação positiva entre os níveis de IL-18 e HbS ( $\rho= 0,369$ ;  $p=0,002$ ) e correlação negativa entre os níveis de IL-18 e HbF ( $\rho= -0,246$ ;  $p=0,050$ ). Além disso, houve também correlação negativa entre os níveis de INF- $\gamma$  com os reticulócitos ( $\rho= -0,281$ ;  $p=0,020$ ). A figura 15 ilustra a correlação entre as variáveis com resultado significativo.

Também foi verificada a correlação entre os pacientes com AF que não usam HU. Os dados da tabela mostram que há correlação positiva entre os níveis de IL-18 om leucócitos ( $\rho= 0,627$ ;  $p= 0,032$ ) e neutrófilos ( $\rho= 0,895$ ;  $p= 0,001$ ). A figura 16 mostra essa correlação.

Ao considerar todos os participantes do grupo controle, foi verificado que as citocinas IL-18 e INF- $\gamma$  não apresentaram correlação com os parâmetros laboratoriais avaliados.

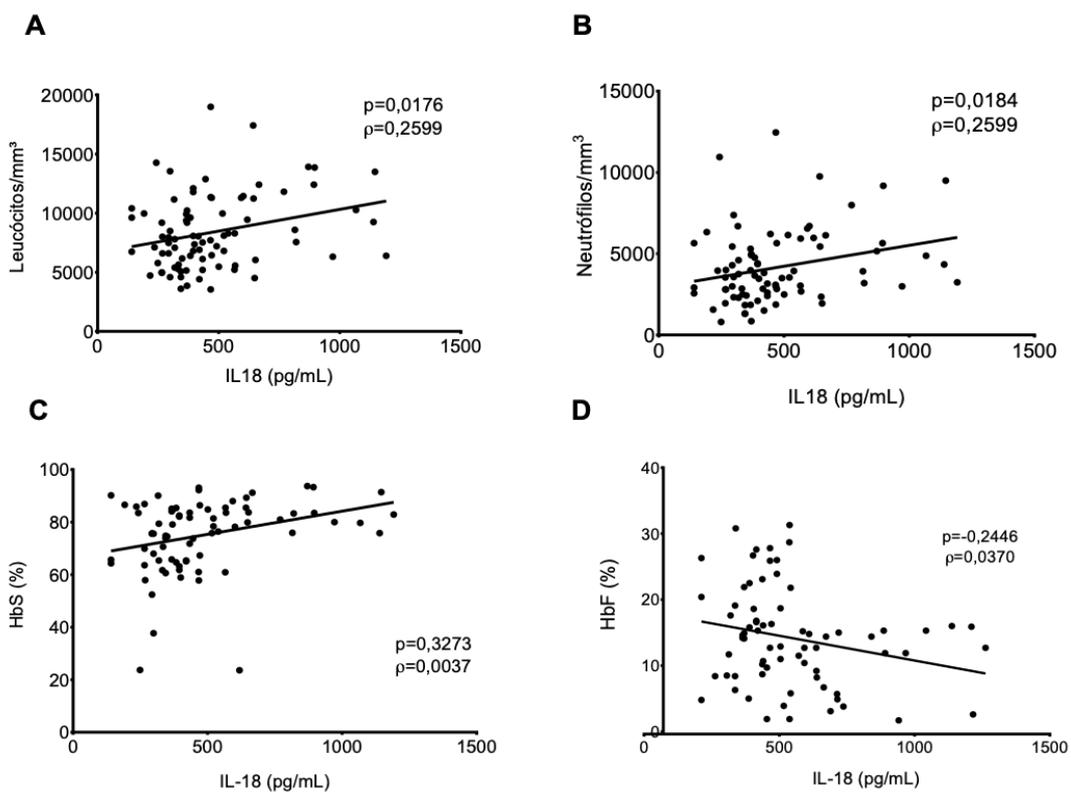
**Tabela 7.** Correlação entre os níveis de IL-18 e INF- $\gamma$  com dados de exames laboratoriais dos participantes do estudo.

Grupo	Parâmetros hematológica	IL-18		INF- $\gamma$	
		Rho	$p$	Rho	$p$
AF	Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	0.260	0.018*	-0.158	0.150
	Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	0.260	0.018*	-0.162	0.142
	Hemoglobina (g/dL)	-0.054	0.624	-0.054	0.621
	Plaquetas ( $\times 10^3$ )	0.198	0.208	-0.069	0.529
	Reticulocitos ( $\times 10^3$ )	0.226	0.094	-0.210	0.065
	Hemoglobina S (%)	0.327	0.004*	-0.109	0.340
	Hemoglobina A2 (%)	0.144	0.209	-0.055	0.631
	Hemoglobina F (%)	-0.244	0.037*	0.099	0.392
Em terapia com HU	Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	0.226	0.058	-0.175	0.139
	Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	0.156	0.196	-0.165	0.165
	Hemoglobina (g/dL)	-0.149	0.214	-0.105	0.378
	Plaquetas ( $\times 10^3$ )	0.111	0.356	-0.130	0.272
	Reticulocitos ( $\times 10^3$ )	0.175	0.160	-0.281	0.020*

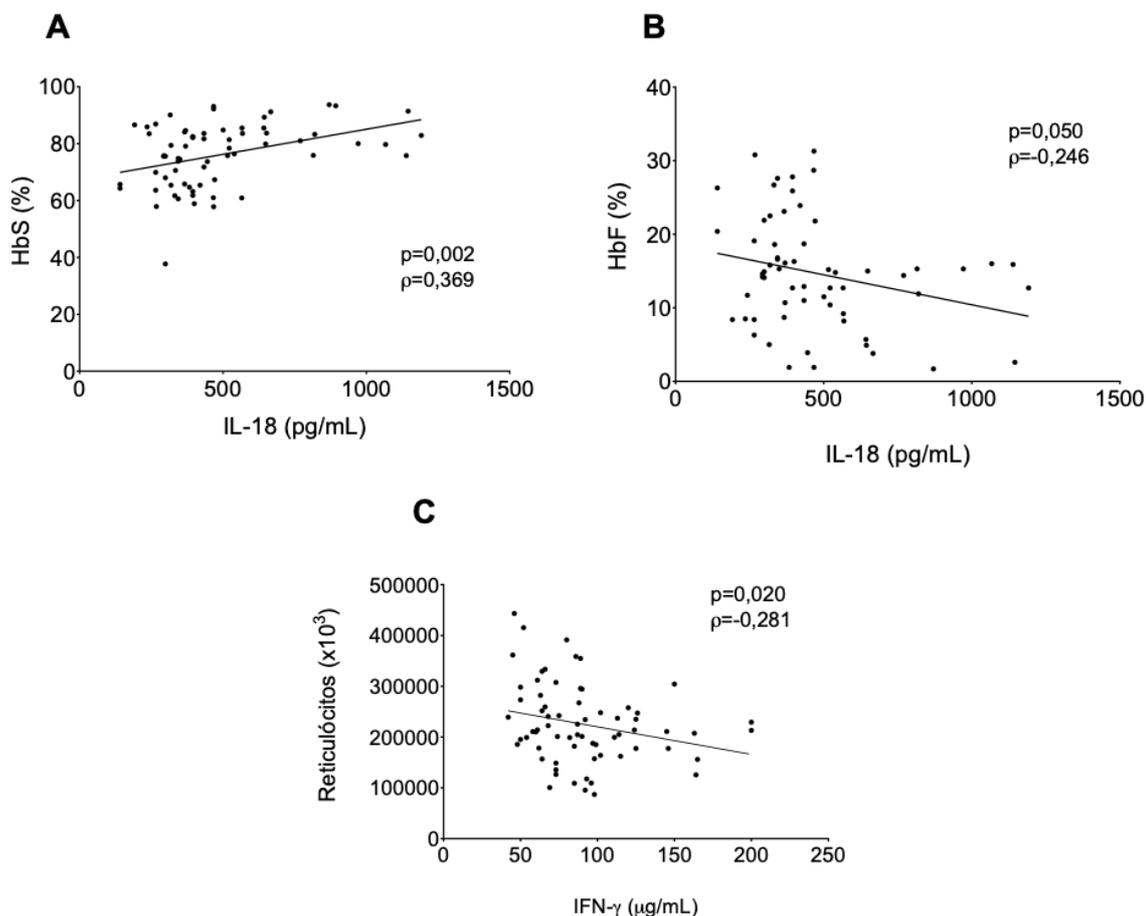
	Hemoglobina S (%)	0.369	0.002*	-0.123	0.322
	Hemoglobina A2 (%)	0.189	0.126	-0.072	0.561
	Hemoglobina F (%)	-0.246	0.050*	0.120	0.336
<b>Sem terapia com HU</b>	Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	0.627	0.032*	-0.109	0.737
	Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	0.895	0.001*	-0.091	0,779
	Hemoglobina (g/dL)	0.522	0.082	0.042	0.897
	Plaquetas ( $\times 10^3$ )	0.448	0.145	0.280	0.379
	Reticulocitos ( $\times 10^3$ )	0.358	0.310	0.455	0.187
	Hemoglobina S (%)	-0.145	0.670	-0.191	0.574
	Hemoglobina A2 (%)	-0.155	0.649	-0.100	0.769
	Hemoglobina F (%)	0.100	0.770	-0.036	0.915
<b>Controle</b>	Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	-0.109	0.560	0.140	0.454
	Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	-0.265	0.157	0.249	0.184
	Hemoglobina (g/dL)	0.060	0.749	0.131	0.484
	Plaquetas ( $\times 10^3$ )	0.071	0.715	0.049	0.802

Legenda: O teste Rho de Spearman foi usado para a correlação entre as variáveis.

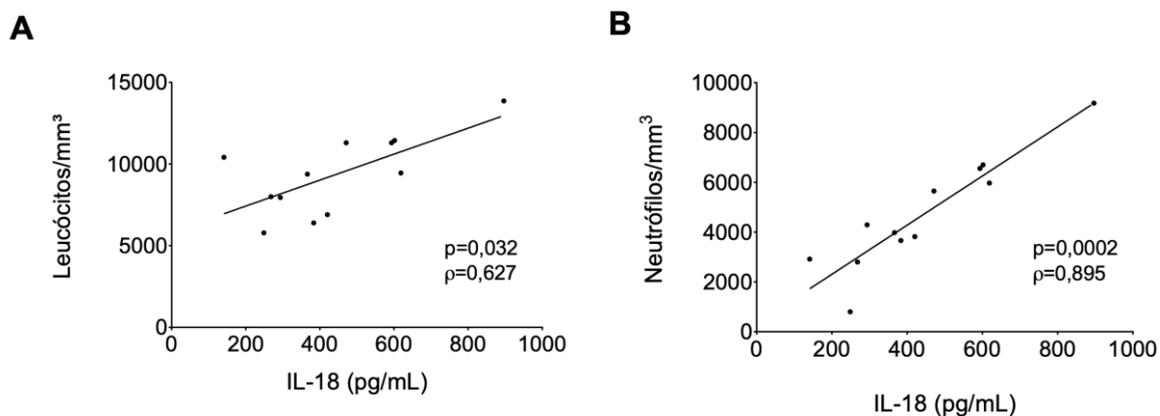
**Figura 14:** Gráficos com as correlações entre a IL-18 com leucócitos (A), neutrófilos (B), HbS (C) e HbF (D), do grupo AF.



**Figura 15:** Gráficos com as correlações entre a IL-18 com a HbS (A) e HbF (B); e entre o INF- $\gamma$  com os reticulócitos (C) em dados de pacientes com anemia falciforme que utilizam a hidroxiureia.



**Figura 16:** Gráficos com as correlações entre a IL-18 com leucócitos (A) e neutrófilos (B) em dados de pacientes com anemia falciforme que não utilizam a hidroxiureia.



## 7 DISCUSSÃO

A anemia falciforme tem como característica a apresentação de polimerização da HbS, vaso-occlusão e disfunção endotelial mediada por hemólise, que juntos geram um processo inflamatório que podem desencadear danos permanentes de tecidos e órgãos dos pacientes portadores (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019). Apesar de ter sido a primeira doença molecular a ser identificada, seus mecanismos fisiopatológicos e inflamatórios ainda não são completamente entendidos (COSTA; CONRAN, 2016).

A literatura científica mostra diversas pesquisas correlacionando a anemia falciforme com os citocinas, sendo elas do tipo pró inflamatórias (CERQUEIRA *et al.*, 2011; KEIKHAEI *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2017; CONRAN; BELCHER, 2018; CONRAN; DE PAULA, 2020; SILVA-JUNIOR *et al.*, 2021; SIRANSY *et al.*, 2023) ou anti-inflamatórias (ALAGBE *et al.*, 2022). O presente estudo mostrou a relação entre a anemia falciforme com o aumento da IL-18.

Similar a outros estudos feitos no Brasil (SANT'ANA *et al.*, 2017; SANTOS; MAIA, 2011; FÉLIX; SOUZA; RIBEIRO, 2010), a maioria dos participantes desta pesquisa, eram do sexo feminino. O estudo de Ceglie e colaboradores (2019), abordou um assunto relevante sobre a anemia falciforme envolvendo a variável sexo. Suas pesquisas sugerem que o gênero pode ser um fator importante no prognóstico da doença. Ao avaliar os prontuários de crianças com AF em um hospital, eles verificaram que crianças do sexo masculino apresentaram mais episódios de crises dolorosas e mais complicações clínicas. Uma das razões pelo qual esse resultado foi obtido, pode estar associado aos níveis de óxido nítrico, que são maiores em indivíduos do sexo feminino (ILESANMI, 2010).

A média da idade dos participantes do presente estudo foi ligeiramente menor para os indivíduos do grupo AF comparados com os indivíduos do grupo controle. A variável idade é de grande relevância para estudos envolvendo a anemia falciforme, visto que a doença apresenta altas taxas de mortalidade, e, embora o prognóstico da doença tenha melhorado nos últimos anos, os pacientes ainda sofrem com a baixa expectativa de vida (LUBECKE *et al.*, 2019). Estima-se que a expectativa de vida do brasileiro que conviva com a doença falciforme seja de apenas 32 anos, enquanto da população em geral, gira em torno de 69 anos (CANÇADO, *et al.*, 2023).

Nos Estados Unidos esses valores são maiores. Um estudo mostrou que a expectativa de vida é de cerca de 54 anos para pessoas com doença falciforme, enquanto a expectativa de vida da população em geral é cerca de 76 anos (LUBECKE *et al.*, 2019). Infecções em geral são as causas mais comuns de morte decorrentes da AF (ARDUINI *et al.*, 2017).

Nesse estudo foi considerado trabalhar com pacientes que estivessem em estado estacionário da doença, fazendo uso ou não da hidroxiureia. Sabe-se que este é o principal fármaco para a terapia de indivíduos com anemia falciforme e está associado a melhora das manifestações clínicas de um modo geral. Alguns benefícios da terapia com HU incluem a redução de crises de dor, preservação da função esplênica, prevenção de danos aos órgãos e melhora da qualidade de vida (AGRAWAL *et al.*, 2014). Nesse estudo, a maior parte dos participantes estava em uso contínuo do medicamento há, pelo menos, quatro anos e outra parte não fazia uso.

As contraindicações e os efeitos adversos que podem ser desencadeados pelo uso contínuo do fármaco, faz com que algumas pessoas não utilizem a HU. Sintomas como dores de cabeça, desconforto abdominal e mudanças dermatológicas (queda capilar, hiperpigmentação na unha), são alguns dos efeitos do uso do medicamento. Todavia, o efeito limitante mais comum do uso de HU na AF é a mielossupressão, com neutropenia e reticulocitopenia. Um acompanhamento do paciente com monitoramento sanguíneo se torna necessário para evitar casos graves de citopenia (VERMA; LAKKAKULA; LAKKAKULA, 2018).

Embora apresente esses efeitos, o fármaco tem se mostrado seguro por décadas, sendo usado em crianças, adolescentes e adultos. Iniciar a terapia ainda na infância, antes da diminuição genética de HbF, apresenta benefícios clínicos e laboratoriais, além de evitar danos e sequelas aos órgãos, gerando uma melhor qualidade de vida ao usuário (MCGANN *et al.*, 2019).

Episódios de dores agudas provenientes de CVO são comuns em pacientes com anemia falciforme e o tratamento com a HU se mostra eficaz na redução dessas dores (ALBOHASSAN *et al.*, 2022). Nesse estudo, verificou-se a frequência da presença e ausência de crises dolorosas entre os pacientes com AF com uso ou não do fármaco. A frequência e o aparecimento das crises foi semelhante entre os dois grupos. No estudo de Albohassan e colaboradores (2022), os autores analisaram o impacto da HU na redução das crises de dor e obtiveram resultados

diferentes, onde a administração de HU esteve associada a redução de crises dolorosas.

Como já se era esperado, foi observado que os parâmetros laboratoriais de pacientes com anemia falciforme foram divergentes em comparação com os participantes do grupo controle, com diferenças nos valores de leucócitos, hemácias, Hb, hematócrito, plaquetas e índices hematimétricos. Resultados semelhantes são apontados no estudo de Antwi-Boasiako e equipe (2018).

O aumento de leucócitos observado é proveniente do processo inflamatório característico da anemia falciforme e estão associados com um pior desfecho clínico. Níveis elevados de células da linhagem branca causam obstrução do lúmen do endotélio vascular; estimulam a produção de ligantes endoteliais que são ativados por moléculas de adesão, causando danos celulares; formam agregados celulares, ao se ligar com outros leucócitos, além de hemácias e plaquetas, ocasionando oclusão e isquemia no vaso; ativam mediadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$  e interleucinas; além de aumentarem a propensão do indivíduo à infecções. Dessa forma, o paciente estará sujeito a apresentar acidente vascular cerebral, síndrome torácica aguda, CVO, entre outras complicações clínicas (YOUSIF, 2022).

Episódios de acidente vascular cerebral, isquemias, tromboinflamação e sequestro esplênico, podem estar relacionadas com um aumento das contagens de plaquetas observadas nos pacientes com AF. Os mecanismos de ativação plaquetária na doença falciforme, ainda não são esclarecidos, mas, sabe-se que a hemólise pode ser um dos fatores que desencadeiam essa ativação (CONRAN; DE PAULA, 2020).

A relação neutrófilo-linfócito (NLR) é considerada um biomarcador ainda pouco explorado em estudos envolvendo a AF. Utiliza valores de fácil acesso que podem indicar o grau de inflamação e o prognóstico da doença. No presente estudo, pode-se observar que essa relação foi menor nos pacientes com a doença. Nos estudos de Maharaj e Chang (2023), onde os autores objetivaram determinar o potencial dessa relação em pacientes com DF, foi demonstrado que a NLR foi mais alta em pacientes com DF associado à infecções bacterianas e a relação foi menor em pacientes que apresentavam apenas CVO.

A literatura mostra desfechos favoráveis com o uso de HU no prognóstico dos pacientes, como valores mais altos de concentração de Hb, volume celular médio (VCM), hemoglobina celular média (HCM) e concentração de HbF (BORBA; LIMA; GROTO, 2003; KEIKHAEI; YOUSEFI; BAHADORAM, 2016; ALBOHASSAN *et al.*,

2022). Ao comparar os indivíduos em uso ou não de HU, verificou-se que o VCM e o HCM foram maiores, corroborando com os achados de outros autores (SILVA-PINTO *et al.*, 2013; YAHOUÉDÉHOU *et al.*, 2019). Borba; Lima e Grotto (2003) sugerem que o aumento do VCM é proporcional ao aumento de HbF. Nesse estudo, entretanto, não houve diferença quanto aos níveis de HbF entre participantes em uso ou não de HU.

Laurentino (2020), em seu estudo sobre AF, fez um comparativo dos parâmetros laboratoriais entre pacientes usuários e não usuários de HU. Foi verificado que a contagem de leucócitos, plaquetas, reticulócitos e LDH foram mais baixas em pacientes com a terapia medicamentosa. Já as pesquisas de Sant'Ana e colaboradores (2017), mostraram que a HU influenciou no aumento das taxas de hemoglobina e no hematócrito dos pacientes. Diversos são os benefícios do fármaco na doença falciforme, incluindo seu potencial anti-inflamatório, efetividade e segurança bem estabelecida (ALBOHASSAN *et al.*, 2022; MCGANN *et al.*, 2019).

Sabe-se que um dos mecanismos de ação terapêutica da HU é a sua capacidade de aumentar os níveis de HbF. Células F com altos níveis de HbF, escapam do processo fisiopatológico da doença, gerando diminuição da polimerização, redução dos danos à membrana eritrocitária, além de diminuir hemólise e inflamação (YASARA; PREMAWARDHENA; METTANANDA, 2021). No presente estudo foi observado que à medida que aumentam-se os níveis de HbF, decorrente do uso de HU, diminuem-se as dosagens de leucócitos, neutrófilos, plaquetas e reticulócitos (correlação negativa). Além disso, observou-se uma correlação da HbF como aumento das contagens de plaquetas.

Considerando que a AF é uma doença inflamatória, estudos envolvendo o papel das citocinas pró inflamatórias se mostram relevantes, uma vez que estas desenvolvem um papel importante na fisiopatologia da doença, além de estar correlacionada à piora dos sintomas e desfechos (CONRAN; BELCHER, 2018). Nessa pesquisa, relacionou-se os níveis de IL-18 e IFN- $\gamma$  em exames laboratoriais de portadores de anemia falciforme de acordo com o uso ou não da HU e estabeleceu-se os níveis de IL-18 com IFN- $\gamma$ , correlacionando-os entre si e com variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes em estudo.

Considerou-se trabalhar com as citocinas IL-18 e IFN- $\gamma$ , visto seu papel importante no processo inflamatório e fisiopatológico da AF. Embora muitos mediadores inflamatórios tenham sido estudados e abordados em pesquisas envolvendo a doença, ainda não está totalmente esclarecido o processo imunológico,

inflamatório e o papel como biomarcadores desses mediadores (COSTA; CONRAN, 2016). Alguns estudos prévios já associaram a IL-18 com a AF (DUARTE *et al.*, 2016; AZEVEDO *et al.*, 2021; GUPTA *et al.*, 2021; SIRANSY *et al.*, 2023) e o IFN- $\gamma$  com a AF (ELALFY *et al.*, 2018; KHALIFA *et al.*, 2018; OKONGWU *et al.*, 2018; MAHMOUD *et al.*, 2020; SILVA-JUNIOR *et al.*, 2021).

Quando comparou-se os níveis de IL-18 e IFN- $\gamma$  entre os participantes com a doença e sem a doença, um aumento dos níveis dessas citocinas foi observado. Esse resultado já era esperado, visto que essas citocinas tendem a aumentar na AF. Entretanto, todos os pacientes com AF se encontravam em estado estacionário da doença e foram escolhidos conforme os critérios de Ballas, ou seja, esses resultados mostram que mesmo os pacientes estando fora da crise, sem episódio de dores agudas, por, pelo menos um ano, os pacientes com AF ainda apresentavam maior concentração de mediadores pró-inflamatórios.

Estudos publicados anteriormente, sugerem que os níveis de citocinas são mais aumentados durante o estado de crise da doença, e que os níveis estão menores quando os pacientes se encontram em estado estacionário (SIRANSY *et al.*, 2023). Costa *et al.* (2019) compararam os níveis de IL-6 entre mulheres gestantes saudáveis e mulheres gestantes com anemia falciforme e também encontram um nível maior da citocina em pacientes com a doença.

Siransy e colaboradores (2023) realizaram um estudo sobre as citocinas da família IL-1 em pacientes com AF residentes em áreas subsaarianas em estado de crise e em estado estacionário. Os autores mensuraram os níveis de 13 citocinas, sendo 3 da família da IL-1 (IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33) e as outras 10, citocinas que estão presentes no processo inflamatório da AF. Os autores verificaram que a IL-33 teve taxa reduzida durante o estado de crise, outras citocinas (IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , MCP-1, IL-12p70 e IL-17A, IL-23) não diferiram entre os grupos e que a IL-18 e IL-33 foram mais altas nos pacientes durante as crises. Adicionalmente, Carvalho *et al.* (2017) avaliaram os níveis de citocinas pró-inflamatórias em participantes saudáveis, em pacientes com AF em estado estacionário e em pacientes com AF em crise. Os resultados mostraram que as citocinas IL-1b, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  estavam elevadas em pacientes com AF em estado de crise, e IL-12 e IL-8 estavam aumentadas em pacientes com AF em crise e em estado estacionário. Na pesquisa de Keikhaei e equipe (2013), níveis diminuídos de citocinas pro-inflamatórias foram encontrados em

pacientes tratados com o HU. Todavia, ao avaliar a influência de HU nos níveis de IL-18 e IFN- $\gamma$  entre os pacientes com AF não foi observado diferenças.

Os parâmetros hematoóxicos e níveis de IL-18 e IFN- $\gamma$  mostraram diferenças significativas quando comparadas com o grupo controle. O uso de HU pareceu não ter influenciado na maioria dos parâmetros hematológicos, exceto nos valores de VCM e HCM, que mostraram resultados significativos. Ademais, HU pareceu não contribuir para a redução da ocorrência e frequência de crises de dor, nem influenciou na redução das citocinas pro-inflamatórias (IL-18 e IFN- $\gamma$ ) ou levou a um aumento dos níveis de HbF quando os parâmetros hematológicos foram avaliados em pacientes com AF.

Considerando que a HU é uma droga cujo mecanismo de ação envolve o aumento dos níveis de HbF (YASARA *et al.*, 2021), a correlação entre HbF e outros parâmetros hematológicos foi avaliada. Apesar da HU não ter influenciado no aumento dos níveis de HbF, seu uso influenciou a correlação negativa entre os níveis de HbF com leucócitos, neutrófilos, plaquetas e reticulócitos, bem como uma correlação positiva entre os níveis de HbF e hemoglobina.

Adicionalmente, níveis elevados de leucócitos e neutrófilos foram associados com aumento dos níveis de IL-18, enquanto níveis reduzidos de HbF correlacionaram-se com aumento de IL-18. Além disso, o aumento da polimerização da hemoglobina (HbS) influenciou o aumento dos níveis de IL-18, mesmo em pacientes submetidos ao tratamento com HU. Esses resultados são particularmente relevantes, uma vez que a AF é a doença hematológica mais frequente em todo o mundo (PINTO *et al.*, 2019).

O fenômeno inflamatório se manifesta por meio de múltiplas interações entre células, tais como neutrófilos, monócitos, plaquetas e hemácias, que desempenham papéis fundamentais na patogênese dessa condição (SILVA-JUNIOR *et al.*, 2021). Ao considerar todos os participantes com AF do estudo (com uso ou não de HU), é possível demonstrar que houve uma associação entre IL-18 e leucócitos e neutrófilos no grupo dos pacientes com anemia falciforme. Sabe-se que contagens aumentadas de leucócitos estão associadas com o piora da gravidade clínica da doença. Investigações em modelos animais revelaram que a aderência de leucócitos e neutrófilos à parede do vaso sanguíneo pode impulsionar o recrutamento subsequente de glóbulos vermelhos, desencadeando, por consequência, o início do processo vaso-oclusivo (DOMINICAL *et al.*, 2014).

Além da associação entre a IL-18 com as células da linhagem sanguínea, o estudo também apontou uma possível relação de aumento da citocina com os níveis de HbS e HbF, onde um aumento de IL-18 esteve associado a um aumento de HbS (correlação positiva) e a uma diminuição de HbF (correlação negativa). Níveis elevados de HbS e diminuídos de HbF estão correlacionados também com a piora do quadro dos pacientes com anemia falciforme e desempenham um papel significativo no aumento da morbidade e mortalidade da doença (CHAMOUINE *et al.*, 2020). De fato, o aumento de HbF traz benefícios para os pacientes com anemia falciforme e é importante pela capacidade que tem em evitar que a célula adquira o formato típico de foice. Entretanto, de acordo com um estudo realizado por Chamouine e colaboradores (2020), níveis aumentados de HbF estavam associados com maior risco de desenvolvimento de vasculopatia cerebral em crianças. Os autores atribuíram o risco ao fato de que as crianças apresentaram menos episódios de vaso-oclusão e conseqüentemente foram hospitalizados com menor frequência, como resultado, o risco de desenvolvimento de vasculopatia cerebral silenciosa foi aumentado. Este é um dos poucos estudos que fazem associação negativa entre o aumento de HbF e a anemia falciforme.

Correlações entre a IL-18 e outros marcadores hemolíticos foram caracterizados por outros autores. Cerqueira *et al.* (2011) mostraram que a citocina apresenta correlação positiva com o aumento de LDH além de uma correlação positiva com o aumento dos níveis de ácido úrico e que essa correlação pode estar relacionada a uma ativação do complexo inflamassoma e outros mecanismos oxidativos.

Já o INF- $\gamma$  não apresentou associação entre os parâmetros laboratoriais ao considerar todos os pacientes com a doença. Sendo a IL-18 um indutor de INF- $\gamma$ , esperava-se que também houvesse essa correlação. Esse achado está alinhado com pesquisas anteriores que observaram níveis elevados de IL-18 sem um aumento correspondente de IFN- $\gamma$  (TURTSEVICH *et al.*, 2024)

Levando em consideração apenas os pacientes que fazem uso de hidroxiureia no presente estudo, é possível observar que os resultados sugerem que quanto maior o nível de IL-18, maiores são os níveis de HbS e menores são os níveis de HbF. Estes resultados foram semelhantes aos resultados anteriores, onde levou-se em consideração todos os pacientes do estudo. Entretanto, quando é realizada a

comparação apenas com os pacientes que não fazem uso do fármaco, não há correlação entre as citocinas estudadas com a HbS ou HbF.

Juntos, os resultados do presente trabalho fornecem informações valiosas sobre o perfil inflamatório de pacientes com AF e sugerem que a IL-18 pode influenciar nos resultados do hemograma e nos níveis de HbF dos pacientes com a doença, podendo ser utilizado como um marcador para o processo inflamatório envolvido. Muitos estudos ainda são necessários para a elucidação de todo o processo da inflamação na doença, e a presente pesquisa pode servir como fonte de investigação para pesquisas posteriores envolvendo a IL-18 e o INF- $\gamma$ .

Algumas limitações para a realização do trabalho foi o número de participantes, que pode gerar limitações na generalização dos resultados. Mas levando em consideração que a pesquisa foi realizada em um centro de hematologia que é referência no Nordeste e que todos os pacientes da macrorregião passaram ou passam por lá, o presente estudo mostrou como é a realidade da doença. Ademais, são necessários estudos adicionais, com amostras maiores e abordagem longitudinal, para aprofundar a compreensão do impacto das citocinas no perfil laboratorial e clínico desses pacientes e validar o uso da IL-18 como possível biomarcador inflamatório na prática clínica.

## 8 CONCLUSÃO

O estudo concluiu que houve associação entre elevação da IL-18 e os parâmetros hematológicos, com elevação dos leucócitos, neutrófilos e HbS. De forma contrária, foi vista uma correlação negativa entre a elevação da interleucina com a HbF e não foram relacionadas associações dos parâmetros com as elevações do IFN- $\gamma$ . Como achado incidental, verificou-se, ao contrário do preconizado pela literatura, que não houve influência do uso da HU sobre os resultados. Esses achados contribuem para a compreensão da resposta inflamatória sistêmica e podem auxiliar na estratificação clínica dos pacientes com AF.

## REFERÊNCIAS

- ADACHI, O. *et al.* Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. **Immunity**, v. 9, p. 143–150, 1998.
- AGRAWAL, R. K. *et al.* Hydroxyurea in sickle cell disease: drug review. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 30, n. 2, p. 91-96, 2014.
- ALAGBE, A. E. Anti-inflammatory cytokines in sickle cell disease. **Molecular Biology Reports**, v. 49, p. 2433-2442, 2022.
- ALBOHASSAN, H. *et al.* Impact of hydroxyurea therapy in reducing pain crises, hospital admissions, and length of stay among sickle cell patients in the eastern region of Saudi Arabia. **Cureus**, v. 14, n. 11, p. e31527, 2022.
- ALMEIDA, E. G. **Caracterização dos polimorfismos dos genes dos receptores dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e das interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-18 e suas relações com o escore de gravidade em portadores de anemia falciforme.** Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas à Hematologia). Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2017.
- ALMEIDA, R. A.; BERETTA, A. L. R. Z. Anemia Falciforme e abordagem laboratorial: uma breve revisão de literatura. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 2, p. 131-134, 2017.
- ANTWI-BOASIAGO, C. *et al.* Hematological parameters in Ghanaian sickle cell disease patients. **Journal of Blood Medicine**, v. 9, p. 203-209, 2018.
- ARDUINI, G. A. O. *et al.* Mortality by sickle cell disease in Brazil. **Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy**, v. 39, n. 1, p. 52-56, 2017.
- ARISHI, W. A.; ALHADRAMI, H. A.; ZOUROB, M. Techniques for the detection of sickle cell disease: a review. **Micromachines (Basel)**, v. 12, n. 15, p. 1-22, 2021.
- AZEVEDO, J. T. C. *et al.* Long-term effects of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation on systemic inflammation in sickle cell disease patients. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 1-15, 2021.
- BADAT, M.; DAVIES, J. Gene therapy in a patient with sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 21, p. 2093-2094, 2017.
- BALLAS, S. K. More definitions in sickle cell disease: steady state v base line data. **American journal of hematology**, v. 87, n. 3, p. 338-338, 2011.
- BHAT, M. Y. *et al.* Comprehensive network map of interferon gamma signaling, **Journal of cell communication and signaling**, v. 12, n.4, p. 745-751, 2018.
- BOĞA, C. *et al.* Comparison of the clinical course of COVID-19 infection in sickle cell disease patients with healthcare professionals. **Annals of Hematology**, v. 100, p. 2195-2202, 2021.

BORBA, R.; LIMA, C. S. P.; GROTO, H. Z. W. Reticulocyte parameters and hemoglobin F production in sickle cell disease patients undergoing hydroxyurea therapy. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 17, n. 22, p. 66-72, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Governo Federal reforça necessidade do diagnóstico precoce da doença falciforme**, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/junho/governo-federal-reforca-necessidade-do-diagnostico-precoce-da-doenca-falciforme>> Acesso em: 18 Ago 2023.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Triagem neonatal biológica: manual técnico**. Brasília, 2016. Disponível em: <[https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/triagem\\_neonatal\\_biologica\\_manual\\_tecnico.pdf](https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/triagem_neonatal_biologica_manual_tecnico.pdf)>. Acesso em: 23 de ago. 2022.

BRITANNICA. **Sickle cell anemia**, 2022. Disponível em: <<https://www.britannica.com/science/sickle-cell-anemia>>. Acesso em: 09 ago. 2022.

CANÇADO, R. D. *et al.* Estimated mortality rates of individuals with sickle cell disease in Brazil: real-world evidence. **Blood Advances**, v. 7, n. 15, p. 3783-3792, 2023.

CARVALHO, M. O. S. Inflammatory mediators in sickle cell anaemia highlight the difference between steady state and crisis in paediatric patients. **British Journal of Haematology**. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/25062/Carvalho%20MO%20Inflammatory%20mediators%20in%20sickle%20cell%20anaemia....pdf?sequence=2>> Acesso em: 25 Ago 2023.

CEGLIE, G. *et al.* Gender-related differences in sickle cell disease in a pediatric cohort: a single-center retrospective study. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 6, n. 140, p. 1-5, 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Data & statistics on sickle cell disease**, 2022. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ncbddd/sicklecell/data.html>>. Acesso em: 09 ago. 2022.

CERQUEIRA, B. A. V. *et al.* Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. **Cytokine**, v. 56, n. 2, p. 471-476, 2011.

CHAMOUINE, A. *et al.* High fetal hemoglobin level is associated with increased risk of cerebral vasculopathy in children with sickle cell disease in Mayotte. **BMC Pediatrics**, v. 20, n. 302, p. 1-13, 2020.

CHARACHE, S. *et al.* Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 20, 1995.

CHATTERJEE, A. *et al.* Sickle Cell Anaemia – A Synopsis of the Inherited Ailment. **Archives of Medicine**, v. 10, n. 2, p. 1-11, 2018.

COATES, T. D. *et al.* Autonomic nervous system involvement in sickle cell disease. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 68, p. 251-262, 2018.

CONRAN, N.; BELCHER, J. D. Inflammation in sickle cell disease. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 68, n. 2-3, p. 263-299, 2018.

CONRAN, N.; DE PAULA, E. V. Thromboinflammatory mechanisms in sickle cell disease - challenging the hemostatic balance. **Haematologica**, v. 105, n. 10, 2020.

COSTA, M. F. H. *et al.* Interleukin-6 in pregnancy with sickle cell disease. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 41, n. 4, p. 298-302, 2019.

DE SANCTIS, V. Foreword – advances in hemoglobinopathies: a new section of Acta Biomedica. **Acta Biomedica**, v. 92, n. 4, 2021.

DIAS-MELICIO, L. A. *et al.* Interleukin-18 increases TLR4 and mannose receptor expression and modulates cytokine production in human monocytes, **Mediators of Inflammation**, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/236839>>. Acesso em: 09 Abr 2023.

DINARELLO, C. A. *et al.* Overview of interleukin-18: more than an interferon- $\gamma$  inducing factor. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 63, p. 658-664, 1998.

DOMINICAL, V. M. *et al.* Prominent role of platelets in the formation of circulating neutrophil-red cell heterocellular aggregates in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 99, p. e214, 2014.

DUARTE, J. D. *et al.* Genome-wide analysis identifies IL-18 and FUCA2 as novel genes associated with diastolic function in African Americans with sickle cell disease. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0163013, 2016.

ELALFY, M. S. *et al.* Immunological role of CD4<sup>+</sup> CD28<sup>null</sup> T lymphocytes, natural killer cells, and interferon-gamma in pediatric patients with sickle cell disease: relation to disease severity and response to therapy. **Immunologic Research**, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12026-018-9010-y>>. Acesso em: 11 Abr 2023.

EMMEL, V. E. Study of the erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle shaped red blood corpuscles. **Archives of Internal Medicine (Chicago)**, v. 20, n. 4, p. 586, 1917.

FANTUZZI, G.; REED, D. A.; DINARELLO, C. A. IL-12 induced IFN- $\gamma$  is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor. **Journal Clinical Investigation**, v. 104, n. 6, p. 761-767, 1999.

- FÉLIX, A. A.; SOUZA, H. M.; RIBEIRO, S. B. F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 3, p. 203-208, 2010.
- FERREIRA, T. F. A. *et al.* Chronic osteo-articular changes in patients with sickle cell disease. **Advances in Rheumatology**, v. 61, n. 11, p. 1-5, 2021.
- FOON, K. A. *et al.* A phase I trial of recombinant gamma interferon in patients with cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 20, n. 3, p. 193-197, 1985.
- GBOTOSHO, O. T.; GOLLAMUDI, J.; HYACINTH, H. I. The role of inflammation in the cellular and molecular mechanisms of cardiopulmonary complications of sickle cell disease. **Biomolecules**, v. 13, n. 2, p. 1-16, 2023.
- GLADWIN, M. T.; SACHDEV, V. Cardiovascular abnormalities in sickle cell disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 59, n. 13, p. 1123-1133, 2012.
- GREEN, N. S.; BARRAL, S. Emerging science of hydroxyurea therapy for pediatric sickle cell disease. **Pediatric Research**, v. 75, n. 1, p. 196-204, 2014.
- GREEN, N. S.; BARRAL, S. Emerging science of hydroxyurea therapy for pediatric sickle cell disease. **Pediatric Research**, v. 75, n. 1, p. 196-204, 2014.
- GUPTA, A. *et al.* IL-18 mediates sickle cell cardiomyopathy and ventricular arrhythmias. **Blood**, v. 137, n. 9, p. 1208-1218, 2021.
- HAHN, E. V.; GILLESPIE, E. B. Sickle cell anemia: report of a case greatly improved by splenectomy; Experimental study of sickle cell formation. **Archives of Internal Medicine**, v. 39, p. 233, 1927.
- HAMIDEH, D.; ALVAREZ, O. Sickle cell disease related mortality in the United States (1999-2009). **Pediatric Blood & Cancer**, v. 60, n. 9, p. 1482-1486, 2013.
- HEMOCE. **Nossa História**, 2022. Disponível em: <<https://www.hemoce.ce.gov.br/institucional/o-hemoce/>> Acesso em: 23 jun. 2022.
- HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Archives of Internal Medicine (Chicago)**, v. 6, n. 5, p. 517-521, 1910.
- HOSOHARA, K. *et al.* Interleukin-18 induces acute biphasic reduction in the levels of circulating leukocytes in mice. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 4, p. 777-783, 2002.
- HUCK, J. G. Sickle cell anemia. **The Johns Hopkins Hospital**, v. 34, p. 335, 1923.
- IHIM, S. A. Interleukin-18 cytokine in immunity, inflammation, and autoimmunity: Biological role in induction, regulation, and treatment. **Frontiers in Immunology**, v. 1, n. 1, p. 1-18, 2022.

ILESANMI, O. O. Pathological basis of symptoms and crises in sickle cell disorder: implications for counseling and psychotherapy. **Hematologic Reports**, v. 2, n. 1, 2010.

KANTER, J. *et al.* Interim results from a phase 1/2 clinical study of lentiglobin gene therapy for severe sickle cell disease. **Blood**, v. 130, n. 1, 2017.

KAPOOR, S.; LITTLE, J. A.; PECKER, L. H. Advances in the treatment of sickle cell disease. **Mayo Clinic**, v. 93, n. 12, p. 1810-1824, 2018.

KATO, G. J. *et al.* Sickle cell Disease. **Nature Reviews Disease Primer**, v. 4, n. 18010, p. 1-50, 2018.

KEIKHAEI, B. *et al.* Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. **European Cytokine Network**, v. 24, n. 1, p. 45-52, 2013.

KEIKHAEI, B.; YOUSEFI, H.; BAHADORAM, M. hydroxyurea: clinical and hematological effects in patients with sickle cell anemia. **Global Journal of Health Science**, v. 8, n. 3, p. 252-256, 2016.

KHALIFA, A. M. *et al.* Role of interferon gamma in the pathogenesis of sickle cell crisis. **UPI Journal of Pharmaceutical, Medical and Health Sciences**, v. 1, n. 2, p. 1-7, 2018.

KOHNE, E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. **Dtsch Arztebl**, v. 108, v. 31-32, p. 532-540, 2011.

KONOTEY-AHULU, F. I. D. Effect of environment on sickle cell disease in West Africa: epidemiologic and clinical considerations. In: ABRAMSON, H.; BERTLES, J. F.; WETHERS, D. L. **Sickle cell disease, diagnosis, management, education and research**. 1. vol. Saint Louis: The C. V. Mosby Company, 1973.

LANGER, A. L. *et al.* Inhaled steroids associated with decreased macrophage markers in nonasthmatic individuals with sickle cell disease in a randomized trial. **Annals of Hematology**, v. 98, n.4, p. 841-849, 2019.

LAURENTINO, M. R. **Avaliação de biomarcadores inovadores no diagnóstico precoce de lesão renal e endotelial em pacientes com anemia falciforme em uso ou não de hidroxiuréia**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

LETTRE, G.; BAUER, D. E. Fetal haemoglobin in sickle-cell disease: from genetic epidemiology to new therapeutic strategies. **The Lancet**, v. 387, p. 2554-2564, 2016.

LUBECKE, D. *et al.* estimated life expectancy and income of patients with sickle cell disease compared with those without sickle cell disease. **JAMA Netw Open**, v. 2, n. 11, 2019.

MACHADO, L. S. B. *et al.* Aspectos bioquímicos e hematológicos da anemia falciforme. **Revista Científica da FMC**, v. 16, n. 2, p. 79-88, 2021.

MAGRIN, E.; MICCIO, A.; CAVAZZANA, M. Lentiviral and genome-editing strategies for the treatment of b-hemoglobinopathies. **The American Society of Hematology**, v. 134, n. 15, p. 1203-1213, 2019.

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. 16, p. 79-82, 2023.

MAHMOUD, A. A. *et al.* Evaluation of immunological role of interferon gamma, Interleukin-10 and T lymphocytes in pediatric patients with sickle cell disease. **Al-Azhar University Journal for Virus Research and Studies**, v. 2, n. 1, p. 1-15, 2020.

MANGLA, A. *et al.* **Sickle Cell Anemia**, In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482164/>> Acesso em 24 Jul 2023.

MCGANN, P. T. *et al.* Robust clinical and laboratory response to hydroxyurea using pharmacokinetically guided dosing for young children with sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v. 94, n. 8, p. 871-879, 2019.

MONUS, T.; HOWELL, C. M. Current and emerging treatments for sickle cell disease. **Journal of the American Academy of Physician Assistants**, v. 32, n. 9, p. 10-14, 2019.

MOTA, F. M. *et al.* Análise da tendência temporal da mortalidade por anemia falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 75, n. 4, p. 1-8, 2022.

NADER, E.; ROMANA, M.; CONNES, P. REVIEW. The red blood cell – inflammation vicious circle in sickle cell disease. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 454, p. 1-11, 2020.

NAKAMURA, K. *et al.* Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 2, p. 590-595, 1989.

NOURAIE, M. *et al.* The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. **Haematologica**, v. 98, p. 464-472, 2013.

OFORI-ACQUAH, S. F. Sickle cell disease as a vascular disorder. **Expert Review of Hematology**, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17474086.2020.1758555>>. Acesso em: 15 ago. 2022.

OKAMURA, H. *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells. **Nature**, v. 378, p. 88-91, 1995.

OKONGWU, C. I. *et al.* Morbidity pattern and interferon gamma level in sickle cell anemia patients with autosplenectomy. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 21, p. 1615-1621, 2018.

PACE, B. S.; STARLARD-DAVENPORT, A.; KUTLAR, A. Sickle cell disease: progress towards combination drug therapy. **British Journal of Haematology**, v. 194, n. 2, p. 240-251, 2021.

PAULING, L. *et al.* Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. **Science**, v. 110, p. 543-549, 1949.

PICCIN, A. *et al.* Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anaemia and possible treatment. **European Journal of Haematology**, v. 102, p. 319-330, 2019.

PIEL, F. B. *et al.* Sickle cell disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1561-1573, 2017.

PINTO, V. M. *et al.* Sickle cell disease: a review for the internist. **Internal and Emergency Medicine**, v. 14, n. 7, p. 1051-1064, 2019.

PITANGA, T. N. *et al.* Effect of lysed and non-lysed sickle red cells on the activation of NLRP3 inflammasome and LTB4 production by mononuclear cells. **Inflammation Research**, v. 70, p. 823-834, 2021.

PITANGA, T. N. *et al.* Sickle red cells as danger signals on proinflammatory gene expression, leukotriene B4 and interleukin-1 beta production in peripheral blood mononuclear cell. **Cytokine**, v. 83, p. 75-84, 2016.

POLAINAS, S. S. M. G. **Talassemias: Etiologia, fisiopatologia, diagnóstico e abordagens terapêuticas**. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de Lisboa, Lisboa, 2017.

PROVOST, L. P. Analytical studies: a framework for quality improvement design and analysis. **BMJ Quality & Safety**, v. 20, n. 1, p. 92-96, 2011.

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

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 376, p. 2018-2031, 2010.

SALES, R. R. **Avaliação da modulação dos níveis de hemoglobina fetal em crianças com anemia falciforme triadas pelo programa de triagem neonatal de Minas Gerais e acompanhadas no hemocentro de Belo Horizonte da fundação HEMOMINAS**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

SALES, R. R. *et al.* Do genetic polymorphisms affect fetal hemoglobin (HbF) levels in patients with sickle cell anemia treated with hydroxyurea? A systematic review and pathway analysis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 1-13, 2022.

SALGAR, S. *et al.* The NLRP3 inflammasome fires up heme-induced inflammation in hemolytic conditions. **Translational Research**, v. 252, p. 34-44, 2023.

SANT'ANA, P. G. S. *et al.* Clinical and laboratory profile of patients with sickle cell anemia. **Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy**, v. 39, n. 1, p. 40-45, 2017.

SANTO, A. H. Sickle cell disease related mortality in Brazil, 2000–2018. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 44, n. 2, p. 177-185, 2022.

SANTOS, F. K. S.; MAIA, C. N. Patients with sickle cell disease taking hydroxyurea in the Hemocentro Regional de Montes Claros. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 2, p. 106-109, 2011.

SANTOS, M. P. *et al.* Perfil epidemiológico de casos notificados da doença falciforme no Ceará, **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 6840-685, 2021.

SAYAD, B; KARIMI, M; RAHIMI, Z. Sickle cell disease and COVID-19: Susceptibility and severity. **Pediatric Blood and Cancer**, 2021. Disponível em < <https://doi.org/10.1002/pbc.29075>>. Acesso em: 05 de Mar de 2023.

SEBASTIANI, P.; STEINBERG, M. H. Fetal hemoglobin per erythrocyte (HbF/F-cell) after genetheryapy for sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v. 98, n. 2, p. e32-e34, 2023.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO MATO GROSSO DO SUL. **Anemia falciforme: desconhecimento sobre a doença tem evitado diagnóstico precoce em MS**, 2021. Disponível em: < <https://www.saude.ms.gov.br/anemia-falciforme-desconhecimento-sobre-a-doenca-tem-evitado-diagnostico-precoce-em-ms/>>. Acesso em: 09 ago. 2022.

SECURE-SCD, Surveillance Epidemiology of Coronavirus Under Research Exclusion for Sickle Cell Disease. **Updates & Data**, 2022. Disponível em: < <https://covidsicklecell.org/updates-data/>>. Acesso em 05 Mar 2023.

SEDRAK, A.; KONDAMUDI, N. P. **Sickle cell disease**, 2021. Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482384/#\\_NBK482384\\_pubdet\\_](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482384/#_NBK482384_pubdet_)>. Acesso em: 12 ago. 2022.

SEGURA, E. E. R. *et al.* Gene therapy for  $\beta$ -hemoglobinopathies: from discovery to clinical trials. **Viruses**, v. 15, n. 713, p. 1-21, 2023.

SESA, Secretaria da Saúde do Estado do Ceará. **Hemoce atende mais de 400 pacientes adultos com doença falciforme**. 2022. Disponível em: < <https://www.saude.ce.gov.br/2022/10/26/hemoce-atende-mais-de-400-pacientes-adultos-com-doenca-falciforme/#:~:text=Hemoce%20atende%20mais%20de%20400%20pacientes%20ad>

ultos,falciforme%20%2D%20Secretaria%20da%20Sa%C3%BAde%20do%20Cear%C3%A1> Acesso em: 15 jun. 2025.

SHET, A. S. LIZARRALDE-IRAGORRI, M. A.; NAIK, R. P. The molecular basis for the prothrombotic state in sickle cell disease. **Haematologica**, v. 105, n. 10, 2020.

SILVA, M. G. P. *et al.* Oral changes in patients with sickle cell anemia of dentistry interest. **Journal of Health Sciences**, v. 20, n. 2, p. 94-99, 2018.

SILVA-JUNIOR, A. L. *et al.* Immunological hallmarks of inflammatory status in vaso-occlusive crisis of sickle cell anemia patients. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 1-14, 2021.

SILVA-PINTO, A. C. *et al.* Clinical and hematological effects of hydroxyurea therapy in sickle cell patients: a single-center experience in Brazil. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 131, p. 4, p. 238-243, 2013.

SINGH, P. J.; SHRIVASTAVA, A. C.; SHRIKHANDE, A. V. Prenatal diagnosis of sickle cell disease by the technique of PCR. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 31, n. 2, p. 233-241, 2015.

SIRANSY, L. K. Are IL-1 family cytokines important in management of sickle cell disease in Sub-Saharan Africa patients? **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 954054, 2023.

SIRANSY, L. K. Are IL-1 family cytokines important in management of sickle cell disease in Sub-Saharan Africa patients? **Frontiers in Immunology**. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10034065/pdf/fimmu-14-954054.pdf>>. Acesso em: 23 Jul 2023, 2023.

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

TAHER, A. T.; WEATHERALL, D. J.; CAPPELLINI, M. D. **Thalassaemia**. *Lancet*, v. 391, p. 155-167, 2018.

TIRON, A.; VASILESCU, C. Role of the spleen in immunity. Immunologic consequences of splenectomy, **Chirurgia (Bucur)**, v. 103, p. 255-263, 2008.

THOMSON, A. M. *et al.* Global, regional, and national prevalence and mortality burden of sickle cell disease, 2000–2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021. **The Lancet Haematology**, v. 10, n. 8, p. e585 - e599, 2023.

TURTSEVICH, I. Z. *et al.* Serum levels of interleukin-18, CXCL9 and IFN- $\gamma$  in Still's disease complicated by macrophage activation syndrome. **Rheumatology Advances in Practice**, v. 8, n.1, 2024.

VARELAS, C. *et al.* Immune response of adult sickle cell disease patients after COVID-19 vaccination: the experience of a Greek center. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, p. 2-8, 2022.

VELUSWAMY, S. *et al.* Vaso-occlusion in sickle cell disease: is autonomic dysregulation of the microvasculature the trigger? **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 1960, p. 1-13, 2019.

VENKATESAN, V. *et al.* Manipulation of developmental gamma-globin gene expression: an approach for healing hemoglobinopathies. **Molecular and Cellular Biology**, v. 41, n.1, 2020.

VERMA, H. K.; LAKKAKULA, S.; LAKKAKULA, B. Retrospection of the effect of hydroxyurea treatment in patients with sickle cell disease. **Acta Haematologica Polonica**, v. 49, n. 1, 2018.

WANG, X.; CHENG, Z. Cross-sectional studies: strengths, weaknesses, and recommendations. **Chest Journal**, v. 158, n. 1, p. 65-71, 2020.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fifty-ninth world health assembly: Sickle-cell anaemia**, 2006. Disponível em <[https://apps.who.int/gb/archive/pdf\\_files/WHA59/A59\\_9-en.pdf](https://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/WHA59/A59_9-en.pdf)>. Acesso em: 09 ago. 2022.

YAHOUÉDÉHOU, S. C. M. A. *et al.* **Hydroxyurea alters hematological, biochemical and inflammatory biomarkers in Brazilian children with SCA: Investigating associations with  $\beta$ S haplotype and  $\alpha$ -thalassemia**. Plos One, 2019. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218040>>. Acesso em: 25 Ago 2023.

YASARA, N.; PREMAWARDHENA, A.; METTANANDA, S. A comprehensive review of hydroxyurea for  $\beta$ -haemoglobinopathies: the role revisited during COVID-19 pandemic. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 16, n. 114, p. 1-12, 2021.

YASUDA, K.; NAKANISHI, K.; TSUTSUI, H. Interleukin-18 in health and disease. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 20, v. 649, p. 1-54, 2019.

YOSHIMOTO, T. *et al.* Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon- $\gamma$  production from activated B cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 3948-3953, 1997.

YOUSIF, T. Y. E. Impact of abnormal leukocyte count in the pathophysiology of sickle cell anemia. **Journal of Blood Medicine**, v. 13, p. 673-679, 2022.

ZANZA, C. *et al.* Cytokine storm in COVID-19: immunopathogenesis and therapy. **Medicina (Kaunas)**, v. 58, n. 2, p. 1-14, 2022.

ZHABYEYEV, P.; OUDIT, G. Y. Sickle cell disease, interleukin-18, and arrhythmias. **Red cells, iron, and erythropoiesis**, v. 137, n. 9, p1138-1139, 2021.

ZÚÑIGA, P. *et al.* Enfermedad de células falciformes: un diagnóstico para tener presente. **Revista Chilena de Pediatría**, v. 89, n. 4, 2018.

## **ANEXO 1 – 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 º Rodolfo Teófilo º 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