

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**INFLUÊNCIA DA HIDROXIUREIA E POLIMORFISMOS NA EXPRESSÃO DE
CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA
FALCIFORME**

MONIK ONEY OLIVEIRA DO NASCIMENTO

Orientador: Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Lopes Albuquerque

Manaus, AM

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**INFLUÊNCIA DA HIDROXIUREIA E POLIMORFISMOS NA EXPRESSÃO DE
CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA
FALCIFORME**

MONIK ONEY OLIVEIRA DO NASCIMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Lopes Albuquerque

Manaus, AM

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

N244i Nascimento , Monik Oney Oliveira do
Influência da hidroxiureia e polimorfismos na expressão
de citocinas inflamatórias em pacientes portadores de
Anemia Falciforme / Monik Oney Oliveira do Nascimento .
24
97 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: José Pereira de Moura Neto
Coorientador: Sérgio Roberto Lopes Albuquerque
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Anemia Falciforme . 2. Hidroxiuréia. 3. Citocinas Inflamatórias.
4. Polimorfismos . I. Moura Neto, José Pereira de. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

“Influência da hidroxiureia e polimorfismos na expressão de citocinas inflamatórias em pacientes portadores de Anemia Falciforme.”

DISCENTE: Monik Oney Oliveira do Nascimento

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 30/09/2024.

Documento assinado digitalmente
 PATRICIA DANIELLE OLIVEIRA DE ALMEIDA
Data: 03/10/2024 17:29:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Patrícia Danielle Oliveira de
Almeida
Coordenadora do PPGCF e Membro Interno

**A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos
seguintes professores:**



Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto
Orientador e Presidente da Banca
(UFAM)

Documento assinado digitalmente
 RAJENDRANATH RAMASAWMY
Data: 01/10/2024 10:55:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy
Membro Externo (UNINILTON/FMT-HVD)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por me fortalecer em momentos de dificuldade por ser meu porto seguro.

À minha família mãe, pai e irmã, por estarem sempre presentes nos momentos bons e sempre me apoiando e incentivando nos momentos difíceis.

Ao meu esposo Daniel pelo companheirismo, suporte, compreensão e por me encorajar a ir além.

À toda família Bio Mol em especial Ana e Érico que sempre foram atenciosos e solícitos nessa jornada.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e incentivo à pesquisa e aos professores do curso que acrescentaram com seus conhecimentos.

Em especial ao meu querido orientador Prof José Neto, por aceitar me orientar sempre com muita paciência e dedicação, por acreditar em mim quando eu mesma já não acreditava, que não me deixou desistir, obrigada por todos os ensinamentos e por sempre estar disposto a ajudar e ensinar.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização desta pesquisa.

EPÍGRAFE

Assim, permanecem agora estes três:

a Fé, a Esperança e o Amor.

O maior deles, porém, é o amor.

1 Coríntios 13:13

RESUMO

Introdução: A Anemia Falciforme (AF) é a hemoglobinopatia hereditária mais prevalente em todo o mundo, resulta de mutação pontual no cromossomo 11 na posição 6 do gene da globina β , levando à substituição do ácido glutâmico pela valina, tal alteração gera hemoglobina variante “S”. **Objetivo:** Caracterizar molecularmente as regiões promotoras e quantificar as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 e TNF- α em indivíduos portadores de AF com e sem tratamento com Hidroxiuréia (HU) e doadores saudáveis. **Métodos:** Para a análise das citocinas foi usado o *BDTM Cytometric Bead Array (CBA) System*, com os KITS: *CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokines* e *CBA Human Inflammatory Cytokines*. A caracterização molecular ocorreu por PCR convencional das regiões promotoras dos genes das citocinas, purificados pela metodologia *ExoSAP-IT™* e posterior sequenciamento pelo método de Sanger. As análises estatísticas foram realizadas nos programas *SPSS vs21* e *Prism vs5*, os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. **Resultados:** Um total de 214 pacientes (HbSS) e 240 controles (HbAA) participaram do estudo. O gênero feminino foi majoritário nos pacientes (62,15%), enquanto o masculino nos controles (74,17%). Os eventos clínicos mais frequentes nos pacientes foram as CVOs (85,2%), seguido por hospitalizações (64,2%). Todos os pacientes, independente do estado clínico apresentaram elevação significativa das citocinas ($P < 0,001$). Frequências significativamente mais elevadas para os genótipos selvagens c.-31CC (IL-1B), c.-251AA (IL-8) e c.-607CC (IL-18) foram encontradas nos doadores de sangue quando comparadas aos pacientes. O genótipo selvagem c.-251AA (IL-8) apresentou-se significativamente mais frequente naqueles sem uso de HU ($p = 0.004$ - OR: 0.22 - CI: 0.07-0.66), apresentando-se como um genótipo de proteção para comorbidades nos pacientes. Associações significativas para elevação das citocinas inflamatórias do estudo foram encontradas no genótipo c-31TT (IL-1B) em ambos os grupos, enquanto o genótipo c.-607AA (IL-18) somente nos pacientes. Já o genótipo mutante c.-251TT (IL-8) apresentou concentração significativamente diminuída em ambos grupos do estudo. **Discussão:** A clínica heterogênea apresentada nos pacientes está de acordo com outros estudos da literatura nacional, predominando as crises oclusivas e hemólise intensa. Apesar dos polimorfismos encontrados em nosso estudo já terem sido previamente descritos, as correlações dos genótipos em pacientes com e sem uso de HU é pela primeira vez descrita. A frequência dos genótipos selvagens c.-31CC, c.-251AA e c.-607CC exercem expressões diferentes, elevando-se principalmente naquelas doenças inflamatórias. O genótipo selvagem c.-251AA (IL-8) apresentou-se como um biomarcador de proteção nos indivíduos, uma vez que estudos demonstram concentrações elevadas da

IL-8 em pacientes que apresentavam crises leves, corroborando com nossos resultados. O encontro em nosso estudo de prevalência e níveis elevados para IL-18 no genótipo mutante c-607AA nos pacientes corrobora com diversos estudos que favorecem a gravidade da doença, o que capacita este SNP como um importante biomarcador inflamatório de risco, envolvendo comorbidades e elevado índice de mortalidade. **Conclusão:** Os eventos mais prevalentes nos pacientes foram as CVOs (85,2%), seguido por hospitalizações (64,2%). Todas as citocinas estiveram elevadas nos pacientes do estudo, com a prevalência mais elevada dos genótipos mutantes. O genótipo selvagem c.-251AA (IL-8) apresentou-se significativamente mais frequente em pacientes falcêmicos sem uso de HU, com sua concentração significativamente mais elevada nos pacientes, enquanto os genótipos mutantes c-31TT (IL-1B) e c.-607AA (IL-18) concentrações plasmáticas significativamente elevadas em ambos grupos.

Palavras-Chave: Anemia Falciforme, Citocinas Inflamatórias; Polimorfismos; Hidroxiuréia.

ABSTRACT

Introduction: Sickle cell anemia (SCA) is the most prevalent hereditary hemoglobinopathy worldwide. It results from a point mutation on chromosome 11 at position 6 of the β -globin gene, leading to the replacement of glutamic acid by valine. This alteration generates variant hemoglobin "S". **Objective:** To molecularly characterize the promoter regions and quantify the cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, and TNF- α in individuals with SCA with and without treatment with Hydroxyurea (HU) and healthy donors. **Methods:** The BDTM Cytometric Bead Array (CBA) System was used to analyze the cytokines, with the KITs: CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokines and CBA Human Inflammatory Cytokines. Molecular characterization was performed by conventional PCR of the promoter regions of cytokine genes, purified by the ExoSAP-IT™ methodology and subsequent sequencing by the Sanger method. Statistical analyses were performed using the SPSS vs21 and Prism vs5 programs, with p-values <0.05 considered significant. **Results:** A total of 214 patients (HbSS) and 240 controls (HbAA) participated in the study. Females were predominant in patients (62.15%), while males were predominant in controls (74.17%). The most frequent clinical events in patients were VOCs (85.2%), followed by hospitalizations (64.2%). All patients, regardless of clinical status, showed significant elevation of cytokines (P<0.001). Significantly higher frequencies of the wild-type c.-31CC (IL-1B), c.-251AA (IL-8), and c.-607CC (IL-18) genotypes were found in blood donors when compared to patients. The wild-type c.-251AA (IL-8) genotype was significantly more frequent in those without HU use (p=0.004 - OR: 0.22 - CI: 0.07-0.66), presenting itself as a protective genotype for comorbidities in patients. Significant associations for elevation of inflammatory cytokines in the study were found in the c-31TT (IL-1B) genotype in both groups, while the c.-607AA (IL-18) genotype only in patients. The mutant c.-251TT (IL-8) genotype showed significantly decreased concentrations in both study groups. **Discussion:** The heterogeneous clinical presentation of these patients is in agreement with other studies in the national literature. Occlusive crises and intense hemolysis predominated. Although the polymorphisms found in our study have been previously described, the correlations of genotypes in patients with and without HU use are described for the first time. The frequency of the wild genotypes c.-31CC, c.-251AA and c.-607CC have different expressions, increasing mainly in those inflammatory diseases. The wild genotype c.-251AA (IL-8) was shown to be a protective biomarker in individuals, since studies demonstrate high concentrations of IL-8 in patients with mild crises, corroborating our results. The finding in our study of prevalence and elevated levels of IL-18 in the c-607AA mutant genotype in patients corroborates several studies that favor the severity of the disease, which enables this SNP as an important inflammatory biomarker of risk, involving comorbidities and a high mortality rate.

Conclusion: The most prevalent events in patients were VOCs (85.2%), followed by hospitalizations (64.2%). All cytokines were elevated in the study patients, with the highest prevalence of mutant genotypes. The wild-type genotype c.-251AA (IL-8) was significantly more frequent in sickle cell patients not using HU, with its concentration significantly higher in patients, while the mutant genotypes c-31TT (IL-1B) and c.-607AA (IL-18) had significantly elevated plasma concentrations in both groups.

Keywords: Sickle Cell Anemia, Inflammatory Cytokines; Polymorphism; Hydroxyurea

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AF	Anemia Faciforme
AS	Traço Falciforme
AVC	Acidente Vasculr Cerebral
CTLA-4	Antígeno associado ao linfócito T citotóxico 4
CVO	Crise Vaso Oclusiva
CO2	Gas carbônico
DAMPS	Padrões moleculares associados a danos
HBA1	Hemoglobina A1
HBA2	Hemoglobina A2
HBC	Hemoglobina C
HBD	Hemoglobina D
HBF	Hemoglobina Fetal
HBS	Hemoglobina S
HBSS	Hemoglobina SS
HLA	Antígenos leucocitários de histocompatibilidade
HU	Hidroxiuréia
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IF	Interferons
IL	Interleucinas
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade de classe I
NETS	Armadilhas extracelulares dos neutrófilos
NK	Natural Killer
NO	Oxido Nítrico
O2	Oxigênio Molecular
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
SEA	Sequestro Esplênico Agudo
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular 1
TLR	Receptor toll-like
TLR4	Receptor toll-like 4
TH	Células T Helper
TNF	Fator de Necrose Tumoral Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
O2	Oxigênio Molecular
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados demográficos na população do estudo	40
Tabela 2: Frequência dos eventos clínicos nos pacientes do estudo	42
Tabela 3: Comparação dos valores Hematológicos e Bioquímicas entre Pacientes e controles do estudo	43
Tabela 4: Frequência e correlação dos genótipos mais prevalentes encontrados na população população do estudo com uso ou não da hidroxiureia	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fisiopatologia da doença falciforme	19
Figura 2: Mecanismo de vaso-oclusão na Anemia Falciforme	20
Figura 3: Manifestações agudas e crônicas da AF	21
Figura 4: Efeitos benéficos da Hidroxiureia na Anemia Falciforme	27

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Número de casos novos para doença falciforme registrados no Programa Nacional de triagem Neonatal16

Quadro 2: Descrição dos primers utilizados para amplificação das regiões promotoras das citocinas.....32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1 Aspectos Gerais da Anemia Falciforme	15
2.1.1 Histórico da doença	15
2.1.2 Aspectos epidemiológicos da Anemia Falciforme	16
2.1.3 Fisiopatologia da Anemia Falciforme.	18
2.1.4 Eventos Clínicos.....	21
2.1.5 Polimorfismos genéticos em Anemia Falciforme	22
2.1.6 Citocinas inflamatórias no desenvolvimento de Anemia Falciforme.....	22
2.1.7 Tratamentos disponíveis para Anemia Falciforme.....	25
2.1.8 Tratamento com Hidroxiuréia.	25
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Tipo de Estudo.	29
4.2 Aspectos Éticos.....	29
4.3 Áreas de Estudo.	29
4.4 Amostragem.....	29
4.5 Critérios de Inclusão e Exclusão.....	30
4.6 Fluxograma de atividades.	30
4.7 Coleta de Material Biológico.....	31
4.8 Dosagem das citocinas.....	31
4.9 Extração de DNA.....	31
4.10 Amplificação gênica	31
4.11 Sequenciamento genético.....	32
4.12 Análise estatísticas.	33
5. RESULTADOS	34
6. CRONOGRAMA	59
7. EQUIPE DO PROJETO.....	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
9. ANEXOS.....	72

1. INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias são o grupo mais comum de doenças genéticas em todo mundo, estão relacionadas à síntese da hemoglobina e geralmente são herdadas de forma autossômica recessiva e caracterizadas por síntese reduzida das cadeias globinas da hemoglobina, como as síndromes de talassemia ou alterações estruturais da hemoglobina das quais as síndromes falciformes são as mais frequentes e clinicamente relevantes (WILLIAMS & WEATHERAL, 2012; TRAEGER & HARTEVELD, 2017).

A hemoglobina é responsável pelo transporte dos gases oxigênio (O₂) e monóxido de carbono (CO₂) no organismo. No estado normal, a hemoglobina humana possui três variantes A1 (HbA1), A2 (HbA2) e hemoglobina Fetal (HbF). A HbA1 é composta por 2 cadeias de globina α e 2 cadeias β , enquanto a HbA2 por 2 α e 2 δ e a HbF por 2 α e 2 γ . A HbF possui elevada afinidade para O₂ em comparação à HbA1 e Hba2 e é a hemoglobina dominante aproximadamente até os 6 meses de vida, substituída posteriormente pela HbA1, tornando-se esta predominante entre 90 a 95% dos indivíduos (SANKARAN & ORKIN, 2013; BROWN et al., 2015; DRVENICA et al., 2022).

Dentre as hemoglobinopatias a Anemia Falciforme (AF) é a mais prevalente em todo o mundo e resulta de uma mutação pontual na posição 6 do gene da β -globina, levando à substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina, tal modificação altera a HbA1 para hemoglobina variante S (HbS) (WEATHERALL & PROVAN, 2000; SUNDD et al., 2019).

A variante HbS quando submetida à baixa tensão de O₂, forma polímeros no interior das hemácias, tornando-as rígidas e alterando sua forma bicôncava para “foice”, fator esse que dificulta o trânsito na microcirculação, causando forte adesão ao endotélio vascular e conseqüentemente contribuindo para crises vaso-oclusivas (CVO) e isquemia tecidual. Pacientes com este quadro clínico evidenciam dores intensas e elevada hipóxia, causando dano crônico aos órgãos e até mesmo morte prematura (ARCHER, 2015; SUNDD et al., 2019).

Outras mutações no gene da beta globina produzem versões anormais e menos prevalentes que a HbS como a hemoglobina C (HbC) e hemoglobina D (HbD). A HbC teve provavelmente origem no oeste da África e espalhou-se pelo mundo como ocorreu com HbS. A HbC possui também uma mutação no 6º códon da beta globina, resultando na troca do ácido glutâmico pela lisina. Em muitos casos, a HbC é considerada menos grave quando comparada à HbS, pois, não ocorre o processo de falcização,

os portadores possuem uma expectativa de vida maior que portadores de HbS (KOHNE, 2011; NAGEL & STEINBERG, 2011; NARDO-MARINO et al, 2022).

A HbD é descrita como HbD-Los Angeles ou D Punjab, no Brasil, esta é terceira variante de hemoglobina mais prevalente. Trata-se de uma mutação pontual com troca de uma glicina por citosina (VELLA & LEHMANN, 1974; TORRES et al., 2014).

Para o diagnóstico da AF os exames laboratoriais utilizados abrangem hemograma, teste de falcização, teste de solubilidade, eletroforese, focalização isoeétrica, imunoenensaio e dosagem de hemoglobina fetal. (NOGUEIRA, 2013; SANTOS, 2021).

O diagnóstico molecular é altamente específico e por este motivo vêm ajudando na elucidação e nas correlações moleculares de muitas doenças, incluindo as hemoglobinopatias (ZANATTA, 2009; FERREIRA et al., 2017).

Em portadores da AF, diversos estudos evidenciam correlações entre vários fatores, incluindo hematológicos, bioquímicos e imunológicos. Com relação a última, as citocinas inflamatórias estão diretamente envolvidas na gravidade clínica das hemoglobinopatias homozigóticas HbSS, HBCC, HbDD e a dupla heterozigose HbSC, dentre estas destacam-se, o fator de necrose tumoral (TNF- α) e as interleucinas (IL) IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 (PATHARE et al., 2003:2004; WILLIAMS & THEIN, 2018; GARCIA et al., 2020).

Apesar de qualquer doença de base genética até o momento não haver cura, nas hemoglobinopatias homozigóticas HbSS, HBCC, HbDD, principalmente na HbSS, existe desde a década de 80 o tratamento com o medicamento Hidroxiuréia (HU). Este medicamento auxilia na redução da sintomatologia pelo aumento da expressão e produção de HbF, diminuindo a polimerização intracelular de HbS, isto porque, HbF possui maior afinidade por O₂. A HU paralelamente com transfusões sanguíneas, são as principais terapias modificadoras da doença, com potencial de prevenir e tratar as complicações agudas e crônicas da AF (PLATT et al., 1984; ZIMMERMAN et al., 2004; KAPOOR, 2018).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos Gerais da Anemia Falciforme

2.1.1 Histórico da doença

A AF teve seu primeiro relato de caso em 1904 em um jovem negro de 20 anos, de origem das Índias Ocidentais, que apresentava sintomas pulmonares, em seu esfregaço sanguíneo periférico foi observado hemácias alongadas em forma de foice, em 1945 Linus Pauling levantou a hipótese de que a doença poderia se originar de uma anormalidade na molécula de hemoglobina, hipótese esta que foi validada em 1949 pela demonstração da migração diferencial de hemoglobina falciforme versus hemoglobina normal quando avaliada por eletroforese em gel (PAULING, 1949).

A AF teve origem na África subsaariana e no Brasil acredita-se que, a doença originou-se em 1550 pelo tráfico de escravos de diversas tribos africanas, para trabalho na cana-de-açúcar no Nordeste e posteriormente, para extração de ouro e metais preciosos em Minas Gerais (RUIZ, 2007; RODRIGUES et al., 2010; STREETLY et al., 2016; MBURU, 2019).

Até meados da década de 1980 (1985), a expectativa de vida dos portadores de AF não ultrapassava duas décadas e não havia tratamento de suporte e/ou chance de melhoria na qualidade de vida destes indivíduos (PLATT et al., 1994; THEIN & HOWARD, 2018; ALKINDI et al., 2024).

O Ministério da Saúde instituiu no ano de 2001 o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), com a portaria GM 822/2001, ampliando o acesso ao teste do pezinho com o objetivo de diagnosticar e iniciar precocemente o tratamento de doenças sem cura, mas possíveis de tratar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

2.1.2 Aspectos epidemiológicos da Anemia Falciforme

Cerca de 20 a 25 milhões de indivíduos em todo o mundo são portadores de AF e 12 a 15 milhões destas vivem na África subsaariana, 5 a 10 milhões na Índia e cerca de 3 milhões distribuídos em outras partes do mundo (SARAF et al., 2014; GHAFURI et al., 2020).

O Brasil possui grande grau de misturas étnicas, com a população contendo raízes principalmente européias, africanas e ameríndias, fator esse que resultou em considerável heterogeneidade (CANÇADO & JESUS, 2007; MIRANDA & MATALOBOS, 2021). Com isso, estima-se que no Brasil um em cada seis recém-nascidos apresentam hemoglobinas estruturais variantes (POMPEO et al., 2022).

De acordo com o Ministério da saúde, no período de 2014 a 2020 a média anual de casos novos de AF em crianças foi de 1.087, apresentando uma incidência de 3,78 a cada 10 mil nascidos vivos. Supoe-se que existem pelo menos 100 mil pacientes portadores com AF no país, sendo ainda considerada como um problema de saúde pública, em decorrência da alta prevalência de morbimortalidade da população (SANTOS et al., 2021; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

De 2000 a 2019 houve 2.422 óbitos por doença falciforme em menores de 20 anos no Brasil, com maior frequência na região Nordeste (40,46%), seguida de Sudeste (39,02%), Centro-Oeste (9,58%), Norte (7,84%) e Sul (3,10%). Os principais atingidos foram pessoas de raça/cor da pele negra (78,73%) (NASCIMENTO et al., 2022).

Os dados epidemiológicos da AF são escassos, fator esse que pode ser justificado devido a subnotificação de casos, no entanto, em novembro de 2023 a doença passou a ser de notificação compulsória obrigatória em todo o país, medida importante para o planejamento da saúde e definição de prioridades de intervenção pública (PIEL et al., 2013; MS, 2023).

O Programa Nacional de Triagem Neonatal do Ministério da Saúde (PNTN/MS) através do teste do pézinho gera o boletim de dados anuais de diagnósticos da doença. De acordo com o PNTN em 2019, foram diagnosticados 1.214 casos de doença falciforme e 61.021 com Hemoglobina S (traço falciforme) (Quadro 1) (MS, 2021).

Quadro 1: Número de casos novos para doença falciforme registrados no Programa Nacional de Triagem Neonatal/ano notificação.

NR: Relatório não encaminhado pelo estado ao Ministério de Saúde. Fenótipos englobados no grupo de doença falciforme – Hb FS, Hb FSC, Hb FSD e Hb FS/Beta talassemia.

UF Brasil	2014	2015	2016	2017	2018	2019
AC	4	5	5	5	5	9
AL	12	10	17	13	16	25
AM	4	5	3	5	0	6
AP	NR	NR	3	NR	NR	NR
BA	185	184	219	203	161	202
CE	20	21	21	13	19	23
DF	42	44	22	39	28	29
ES	17	29	29	30	37	59
GO	32	29	44	40	37	32
MA	84	54	22	29	37	59
MG	166	185	152	161	143	238
MS	8	8	7	8	5	9
MT	17	14	12	19	31	23
PA	27	10	4	13	6	NR
PB	1	11	7	9	1	7
PE	21	47	39	35	57	63
PI	24	34	58	21	23	35
PR	10	10	12	8	10	11
RJ	127	112	85	44	120	103
RN	14	7	5	5	7	3
RO	7	10	13	7	15	9
RR	4	2	0	0	18	6
RS	13	21	32	33	28	22
SC	3	6	4	11	4	13
SE	28	12	18	11	12	21
SP	281	258	231	190	249	223
TO	9	21	7	7	4	10
Total	1166	1149	1071	959	1083	1214

Fonte: PNTN-CGSH/DAET/SAES/MS(2019).

2.1.3 Fisiopatologia da Anemia Falciforme

A AF é caracterizada como uma doença multissistêmica podendo afetar todos os órgãos do corpo e manifestar-se de forma aguda ou crônica. Os indivíduos com AF apresentam quadro clínico bastante heterogêneo (CASTRO et al., 1994; ADORNO et al., 2005; PECKER & LITTLE, 2017).

Os principais eventos da fisiopatologia da AF são a hemólise e as CVOs que ocorrem devido ao complexo fenômeno de polimerização da HbS, essencial para a ocorrência da doença, isso se deve à liberação dos componentes celulares da hemoglobina com a ruptura do eritrócito, além da elevada concentração da HbS, outros fatores contribuem para a polimerização como o grau de desoxigenação da célula, pH, concentração intracelular de HbF e temperatura,. (EMBURY et al., 1995; KATO et al., 2018; VORST, 2020).

A polimerização da molécula HbS no interior dos eritrócitos é o pilar na patogênese da doença e suas complicações e quanto maior o conteúdo de HbS, mais grave o quadro clínico do paciente (EATON, 2020) (Figura 2). As crises dolorosas recorrentes estão associadas a condições autoinflamatórias acompanhadas por aumento na concentração de citocinas imune inatas e o meio inflamatório da AF, promovendo a ativação do inflamossoma plaquetário, através de citocinas inflamatórias que ativam receptores nervosos periféricos causando sensibilização periférica e hiperalgesia (REES et al., 2022).

Além da precipitação de HbS no interior dos eritrócitos e ativação do endotélio vascular, a resposta inflamatória gerada pela interação destas células desempenha importante papel na fisiopatologia da doença, com elevada expressão de um estado inflamatório crônico (STEINBERG & RODGERS, 2001; CONRAN et al., 2009; SUNDD et al., 2019; GLAROS et al., 2021).

A resposta celular contribui para a ativação de neutrófilos, monócitos, mastócitos, células endoteliais, células dendríticas e células NK, todos regulados por mediadores inflamatórios impulsionados principalmente por moléculas imunológicas como citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (HEBBEL et al., 2004; ZHANG et al., 2016; ALLALI et al., 2020).

A polimerização da HbS também pode ocorrer em reticulócitos, que nos pacientes crônicos possuem percentual médio de até 20% (KATO et al., 2018). A hemácia falciforme se rompe prematuramente devido a fragilização após vários ciclos de falcização, com meia vida média de apenas 10 dias (MCCURDY & SHERMAN, 1978; CONRAN et al., 2009).

Com sua ruptura no interior dos vasos, ocorre a liberação de moléculas de ferro, grupo heme e óxido nítrico na corrente sanguínea, o heme livre, um produto direto da destruição da hemoglobina, é o principal responsável por muitos sintomas associados à doença isso porque ele atua diminuindo a disponibilidade de óxido nítrico (NO) que é um vasodilatador gerando como consequência a vasoconstrição, processos oxidativos, inflamatórios e liberação exacerbada de citocinas (BALLA et al., 2007; CONRAN et al., 2009; GOZZELINO et al., 2010; ASHOURI et al., 2021).

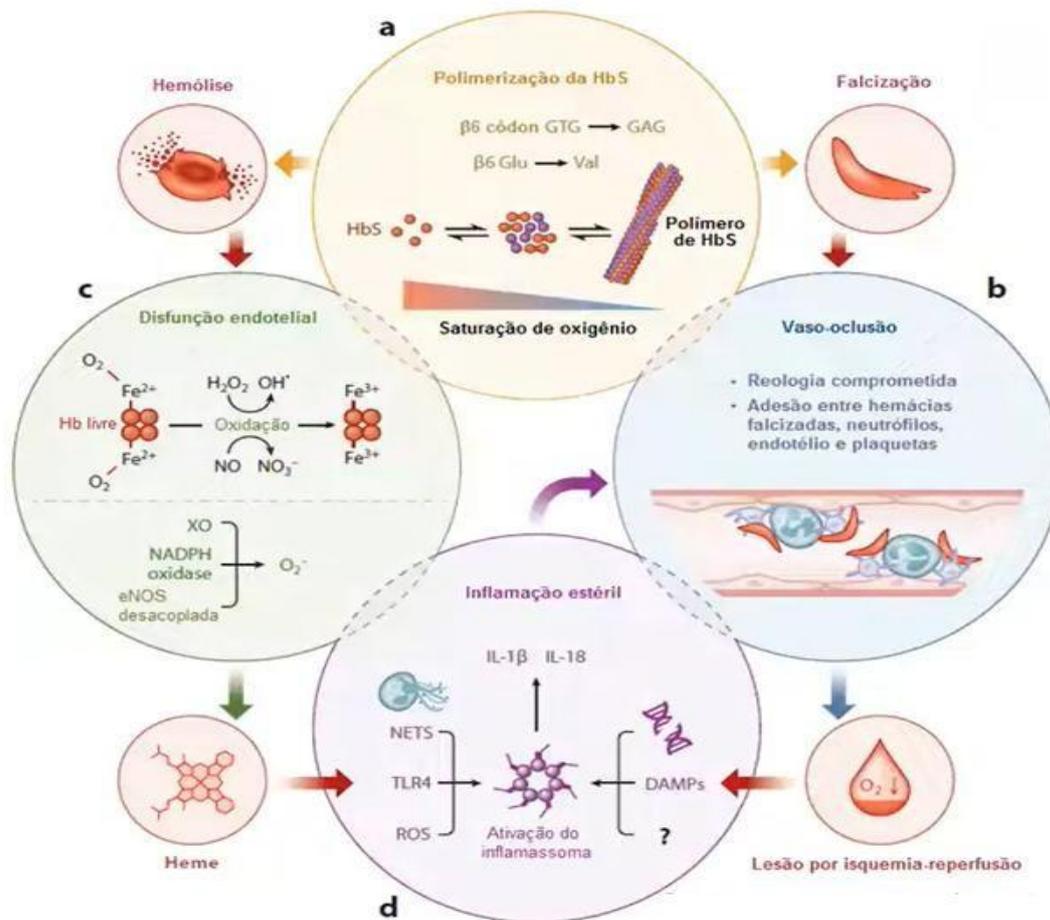


Figura 1: Fisiopatologia Molecular da Doença Falciforme.

a) Polimerização da HbS na ausência de O_2 e falcização do eritrócito; b) Reologia comprometida devido falcização e adesão de células gerando vaso-oclusão; c) Disfunção endotelial provocada por componentes da hemólise livres no vaso sanguíneo; d) Inflamação gerada pelas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETS), ativação do receptor Toll-like 4 (TLR4), liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), ativação do inflamassoma e liberação de citocinas inflamatórias.

Fonte: Adaptado de (SUNDD et al., 2019).

Diversos estudos descrevem moléculas inflamatórias com níveis elevados na AF (Figura 2). Destaca-se principalmente TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- α), IL-1 β , IL-8 e IL-6 e algumas proteínas antiinflamatórias como a IL-10, estando a última destas elevada justamente para limitar a produção de moléculas inflamatórias (TOZATTO et al., 2020).

Embora a inflamação desempenhe um papel importante na fisiopatologia da doença, as vias inflamatórias envolvidas nas complicações ainda não são completamente descritas. Este estado inflamatório crônico participa diretamente em diversas clínicas observadas nos pacientes, bem como para sua menor sobrevida e qualidade de vida (FRENETTE, 2002; ALAGBE, 2022).

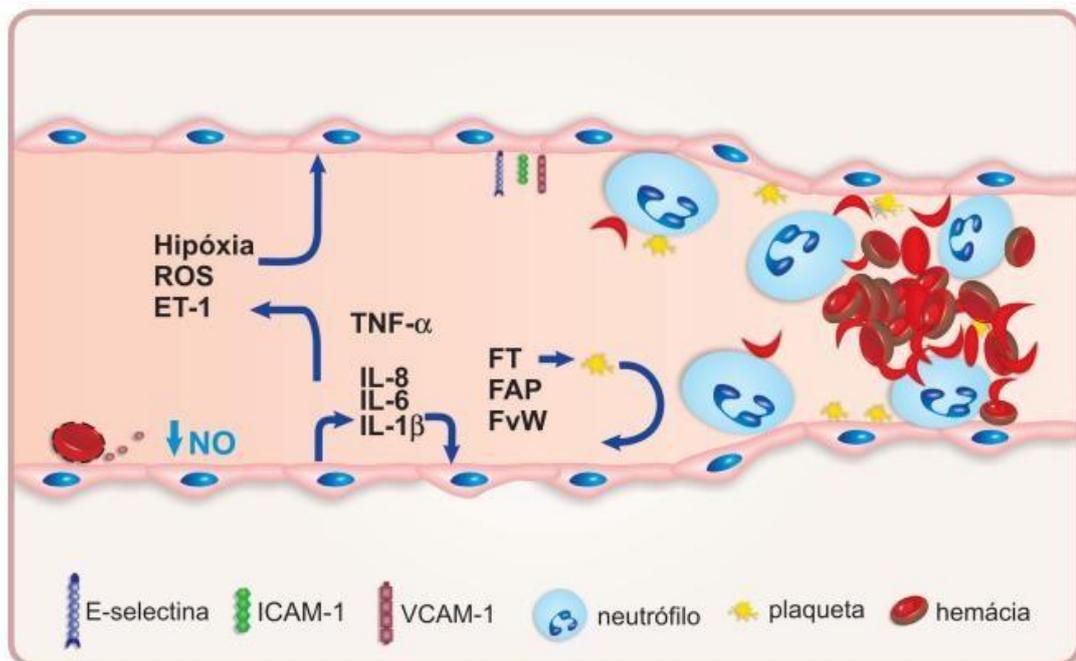


Figura 2: Mecanismo de vaso-oclusão na Anemia Falciforme.

Endotélio ativado com presença de plaquetas aderidas à parede vascular; aumento da expressão das moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e E-selectina, liberação de citocinas e quimiocinas como o IL-8, IL-6 e IL-1 β , e TNF- α , inflamação vascular e a ativação das células sanguíneas, adesão de leucócitos e as hemácias; redução no fluxo sanguíneo favorecendo hipóxia e falcização das hemácias, obstrução do vaso resultando em vaso-oclusão.

Adaptação: SEGEL et al., 2011; MORIKIS et al., 2021.

2.1.4 Eventos Clínicos

Como anteriormente dito, apesar de, os portadores apresentarem a mesma mutação genética, os eventos clínicos manifestam-se de maneira heterogênea, podendo diferenciar inclusive a expectativa de vida dos indivíduos (BELINI et al., 2015).

As complicações da AF são caracterizadas como agudas ou crônicas (Figura 03), quando agudas podem incluir crise hepática, colecistite, sequestro esplênico agudo (SEA), acidente vascular cerebral (AVC), anemia aguda, priapismo, dor e falência multissistêmica de órgãos entre outras. Já as manifestações crônicas são caracterizadas além de dor crônica, danos a órgãos como rins, fígado, coração, pulmão, necrose avascular, infarto cerebral, retinopatia, úlceras nas pernas e anemia crônica. Embora a incidência dessas complicações aumente com a idade, o início dos sintomas pode ocorrer antes mesmo do primeiro ano de vida (BRAGA, 2007; KATO et al., 2018; ONIMO E & ROTZ, 2020).

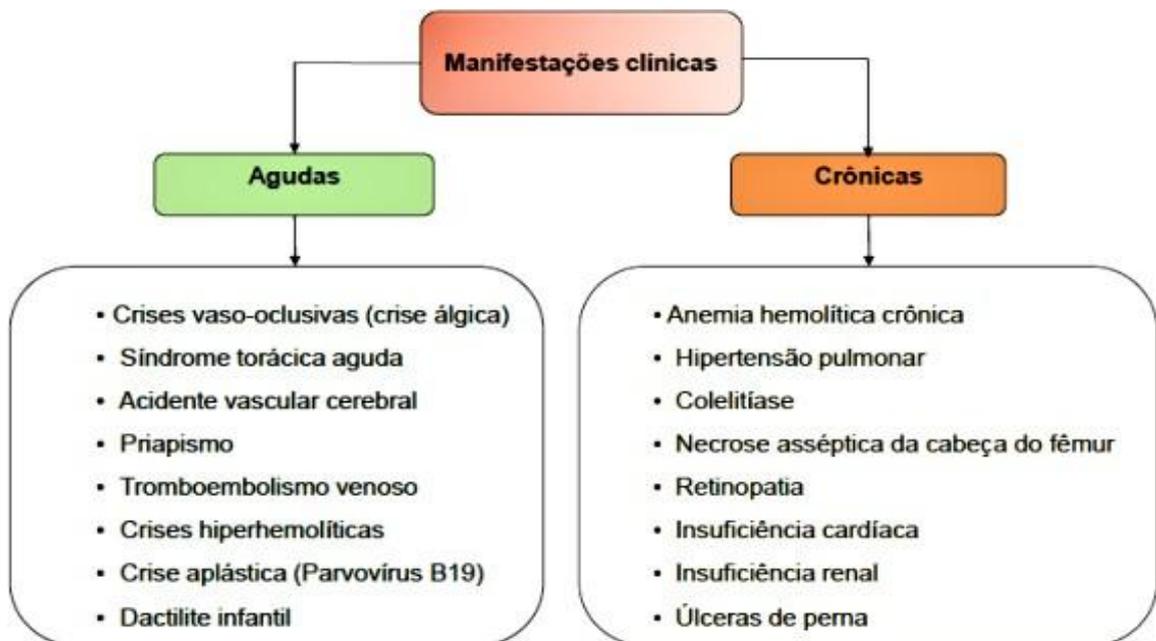


Figura 3: Manifestações clínicas agudas e crônicas da AF.

Fonte: Adaptado de (KATO et al., 2018).

As CVO são as principais manifestações clínicas da doença e podem ocorrer precocemente, a partir dos três meses de vida do indivíduo, atingindo nesta idade, os pequenos ossos das mãos e dos pés, denominada dactilite, sendo tipicamente a primeira manifestação dolorosa da doença e é considerada a complicação mais grave e maior causa de hospitalizações em crianças (LOUREIRO & ROZENFELD, 2005; TOSTES et al., 2009).

No SEA ocorre o aprisionamento das hemácias falcizadas no baço, ocasionando a esplenomegalia, o que a depender das crises, pode levar ao infarto esplênico. Esta clínica, quando ocorre ainda na fase infantil, acarreta a morte em 20% dos casos, representando a segunda causa mais comum de morte na AF ainda na primeira década de vida (BATALIOTTI & SOUZA, 2020).

A AF apresenta em muitos casos efeitos neurocognitivos o que pode ocasionar déficits de memória, dificuldades em trabalhos escolares e dificuldades com a adesão à medicação. Pacientes falcêmicos adultos, não apresentam sintomas neurológicos, todavia, sua anemia crônica pode induzir comprometimento neurocognitivo secundário à hipoxemia cerebral (VICHINSKY et al., 2010; BALLAS, 2011).

2.1.5 Polimorfismos genéticos em Anemia Falciforme

Decádas após a primeira descrição da diferença química entre hemoglobina normal e falcizada, a doença tornou-se um dos mais bem caracterizados distúrbios humanos. No entanto, enquanto sua heterogeneidade clínica tem sido reconhecida há muito tempo, diversas pesquisas científicas nos últimos 20 anos tentaram elucidar o papel de vários fatores responsáveis pela sua variabilidade clínica existente, descobriu-se que a fisiopatologia da AF é extremamente complexa envolvendo diversos fatores além dos eritrócitos falcizados, as células do sistema imune inato como monócitos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células natural killer (NK), plaquetas, macrófagos e mastócitos. (NAGEL & LABIE, 1989; NAGEL & STEINBERG, 2001; ALLALI et al., 2020).

Os polimorfismos genéticos apresentam grande importância para o curso de todas as doenças e nos portadores de AF tornou-se mais evidente quando em uso de HU (FERTRIN & COSTA, 2010; TOZATTO-MAIO et al. 2020). As variações genéticas nas respostas imunes e polimorfismos em vários genes de citocinas podem implicados como importantes biomarcadores de desfechos clínicos específicos em pacientes com AF (GILI et al., 1995; BALDWIN et al. 2005).

2.1.6 Citocinas envolvidas no desenvolvimento de Anemia Falciforme

Citocinas são mediadores solúveis de resposta imune produzidas durante um processo inflamatório, representam um grupo de proteínas ou glicoproteínas de baixo peso molecular secretadas em resposta a um antígeno, modulando a intensidade e a duração da resposta imune

e inflamatória (HOLT & JONES, 2000). As primeiras citocinas descritas produzidas por leucócitos foram as interleucinas (IL), interferons (IFN) e os fatores de necrose tumoral alfa e beta 9 (TNF- α e TNF- β) (KAISER et al., 2004).

As citocinas podem atuar por vários mecanismos, podem agir nas mesmas células que as secretaram (ação autócrina), em células vizinhas (ação parácrina) e/ou em células distantes das que as produziram (ação endócrina) (ZHANG & AN, 2007).

São produzidas por múltiplas populações celulares, entre elas o tecido nervoso periférico, mastócitos, células endoteliais e células de Schwann, todavia, a predominância na produção e secreção são células T auxiliares (Th) e macrófagos residentes recrutados (XIE et al., 2006).

As citocinas podem também contribuir para etiologia de várias doenças e estado de sua gravidade. O efeito das citocinas depende primeiramente do tempo de liberação, o local onde ela está agindo, da presença de elementos sinérgicos e da intensidade dos receptores (BARTEE & MCFADDEN, 2013).

O Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina reguladora do sistema imunológico, com funções homeostáticas benéficas e vitais para um funcionamento adequado do sistema imunológico, sendo indispensável para combater patógenos e prevenir a propagação de infecções (MARINO, 1997). É produzido principalmente por macrófagos e células T, e é o principal mediador da resposta inflamatória, principalmente recrutando neutrófilos e monócitos para o local da inflamação (GEARING et al., 1994).

É uma potente citocina com ampla gama de atividades pró-inflamatórias, incluindo a ativação de células endoteliais, estimulação de inflamação, indução da cascata de coagulação, febre e síntese de proteínas de fase aguda; ativação de neutrófilos, e estimulação da adesão de neutrófilos (ROCHA et al., 1997; TAVAKKOLI et al., 2004; DONG C, 2006; ABBAS et al. 2007).

Os efeitos de TNF- α incluem aumento da permeabilidade vascular, indução da expressão de moléculas de adesão, migração de células inflamatórias do compartimento vascular, liberação de mediadores inflamatórios causadores de dano tecidual e produção de citocinas, aumento da aderência ao endotélio por estimular a produção de moléculas de adesão, como selectinas, (VCAM-1) e (ICAM-1) (MAINI, 1996; SNELLER & FAUCI, 1997; KEIKHAEI et al., 2013).

A interleucina 1 β (IL-1 β) pertence ao grupo com funções imuno-regulatórias, pró-hematopoiéticas e pró-inflamatórias e está associada a ativação de leucócitos, monócitos e neutrófilos como potente citocina pró-inflamatória, crucial na resposta imune do hospedeiro à

infecções, (NAKAE et al., 2003; TURNER et al., 2014; DEMBIC, 2015). A IL-1 β é produzida e secretada por uma variedade de tipos celulares do sistema imunológico inato, com níveis elevados descritos em portadores de AF, apontando intensa e maléfica resposta inflamatória (FERRERO et al., 2007; ASARE et al., 2010). Esta citocina participa ativamente da fisiopatologia da AF, ligando-se nos leucócitos e células vasculares, promovendo uma cascata de eventos que levam à ativação de neutrófilos e plaquetas e regulação positiva de ligantes como as E-selectina, P-selectina, VCAM- 1, ICAM-1 promovendo vaso-oclusão (ZHANG et al., 2016; KATO & GLADWIN, 2017; CONRAN et al., 2019).

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina multifatorial com atividade pró e anti-inflamatória, produzida de forma imediata em resposta a infecções e lesões teciduais, contribuindo para a defesa do hospedeiro por meio da estimulação de respostas de fase aguda, hematopoese e reações imunes, estimula a proliferação de células B e T plasmática, a IL-6 desmora um efeito patológico na inflamação crônica e na autoimunidade (POPKO et al., 2010; TANAKA et al., 2014; ALLALI et al., 2020). A IL-6 participa de muitas funções, incluindo a estimulação de linfócitos B, proteínas de fase aguda hepática, funções metabólicas e neurotróficas. É portanto um potente modulador da diferenciação, maturação e proliferação leucocitária, além de estimular a resposta inflamatória por meio da produção de proteínas de fase aguda (ALAGBE et al., 2017; ZANETTE et al., 2019). A IL-6 tem um papel central na manutenção da defesa imune contra infecções pela produção de proteínas de fase aguda, fatores de diferenciação mielóide e proliferação celular (NARAZAKI et al., 2017; VONA et al., 2021). O quadro inflamatório crônico no paciente falcêmico possui intensa participação da IL-6, sendo importante na continuidade do quadro inflamatório e elevação na expressão de moléculas de adesão que agravam os sintomas vasooclusivos (GABAY et al., 2013).

A interteucina 8 (IL-8) é uma citocina produzida por monócitos e linfócitos atua como quimiotático ativador de neutrófilos sendo fundamental para o equilíbrio da resposta imune. Níveis elevados da citocina IL-8 podem estar associados a um agravamento clínico na AF, comumente elevadas em CVOs (DOMINGOS et al., 2020; AIRI et al., 2024). Em seu estudo GOMES et al., (2023) identificou que o grupo de portadores de AF apresentou níveis mais baixos do que quando comparado ao grupo Hb-AS, que são os portadores de traço falciforme e não manifestam a clínica da doença.

A interleucina 10 (IL-10) foi descrita pela primeira vez como mediador na inibição da síntese de outras interleucinas inflamatórias (FIORENTINO et al., 1989). A IL-10 atua na diminuição da produção de mediadores inflamatórios e desempenha um papel importante na biologia dos linfócitos B e T, sugerindo-se desta forma, participação do processo de regulação

do estado pró-inflamatório (SARRAY et al., 2015). Na AF, a IL-10 vem sendo alvo de muitos estudos, demonstrando níveis diminuídos nas CVO, enquanto elevados nas crises hemolíticas, sendo inclusive um marcador de risco para esta clínica (SARRAY et al., 2015).

LANARO et al., (2009) demonstraram em seu estudo níveis elevados de IL-10 concomitantemente com elevados níveis plasmáticos de IL-6 em CVO, enquanto outros estudos em pacientes em estado estacionário demonstraram níveis plasmáticos diminuídos nas CVO (HOFMANN et al., 2012; WALTER, 2014; SARRAY et al., 2015; NIU et al., 2019; ALLALI et al., 2020).

A interleucina 18 (IL-18) é uma citocina pró-inflamatória apontada como cofator na produção de interferon gama (INF- γ) (NAKANISHI et al., 2001). A IL-18 apresenta-se como um fator pleiotrópico estimulando a proliferação de células T ativadas, elevando a toxicidade de células natural killer (NK) e o fator de crescimento de macrófagos (CALVANI et al., 2005; HUNG et al., 2005).

Existem algumas evidências de que elevadas concentrações plasmáticas de IL-18 estão associadas à disfunção diastólica em pacientes com AF (DUARTE et al., 2016). Sua participação no desenvolvimento da doença está associada a eventos de SEA nos pacientes, ressaltam ainda que níveis elevados de IL-18 estão presentes em pacientes tratados com transfusão crônica ou HU (WENDELL, 2010; DUARTE et al., 2016; DINARELLO & KAPLANSKI, 2018).

2.1.7 Tratamentos utilizados para Anemia falciforme

As estratégias atuais de tratamento da AF incluem penicilina profilática e imunizações para diminuição da ocorrência de infecções pneumocócicas, o medicamento hidroxiuréia, transfusões sanguíneas e transplante de medula óssea (ONIMOE & ROTZ, 2020).

Nos pacientes com AF, as transfusões ajudam a fornecer quantidades de hemoglobina e hemácias normais, elevando a capacidade de transporte de O₂ e reduzindo as complicações e chances de desenvolver principalmente hemólise e CVO, além de reduzir o risco de AVC grave (ADAMS et al., 1998; TSITSIKAS et al., 2016; WILLIAMS & THEIN, 2018). O transplante de medula óssea, atualmente, é o único meio de cura da doença. Uma análise envolvendo aproximadamente 1.000 transplantados de doadores irmãos HLA idênticos realizados entre 1986 e 2013 revelou excelentes resultados com crianças e adultos, demonstrando 93% de sobrevida geral (GLUCKMAN et al., 2017). Infelizmente, menos de 14% dos pacientes com AF possuem irmãos HLA compatíveis como doadores potenciais

(BOLANOS et al., 2012).

2.1.8 Hidroxiuréia no tratamento de Anemia Falciforme

A HU também conhecida como hidroxycarbamida é um fármaco antineoplásico e o principal tratamento farmacológico para pacientes com AF. Possui ação na elevação da concentração de HbF nas hemácias, melhorando a interação eritrócitos-endotélio e densidade eritrocitária (MILLER et al., 2010). Somado a isso, a HU diminui significativamente o número absoluto de neutrófilos, monócitos e reticulócitos no sangue periférico, bem como a expressão de moléculas de adesão e citocinas inflamatórias (Figura 04) (CHARACHE et al., 1996; WARE et al., 2016).

A HU reduz significativamente as citocinas inflamatórias e inibe o processo inflamatório nos tecidos após isquemia de reperfusão (LANARO et al., 2006; PULE et al., 2015). A HU é um inibidor da ribonucleotídeo redutase, em uso há muitos anos para o tratamento de distúrbios mieloproliferativos. Após a demonstração de sua capacidade de induzir a produção de HbF em babuínos, a HU foi testada em vários ensaios clínicos em adultos com AF (ELFORD, 1968; PLATT et al., 1984; MCGANN & WARE, 2015).

Posteriormente, foi realizado um estudo maior que demonstrou uma diminuição acentuada na frequência de crises dolorosas e síndrome torácica aguda além da redução nos requisitos de transfusão e hospitalizações em adultos (CHARACHE et al., 1995). A HU é rapidamente absorvida e atinge o nível plasmático máximo entre 20-60 minutos, após sua administração e meia vida plasmática de três a quatro horas, sendo metabolizada no fígado e excretada por via renal (OLIVEIRA, 2017).

Além da redução do número de CVOs, a HU possui impacto positivo na qualidade e sobrevida dos pacientes com AF, reduzindo significativamente o número de hospitalizações, tempo de internação, ocorrência de síndrome torácica aguda e necessidade de transfusão eritrocitária, exercendo efeito positivo na mortalidade de até 40% dos pacientes (STEINBERG 2008; BRAWLEY, 2008; FIELD & NATHAN, 2014).

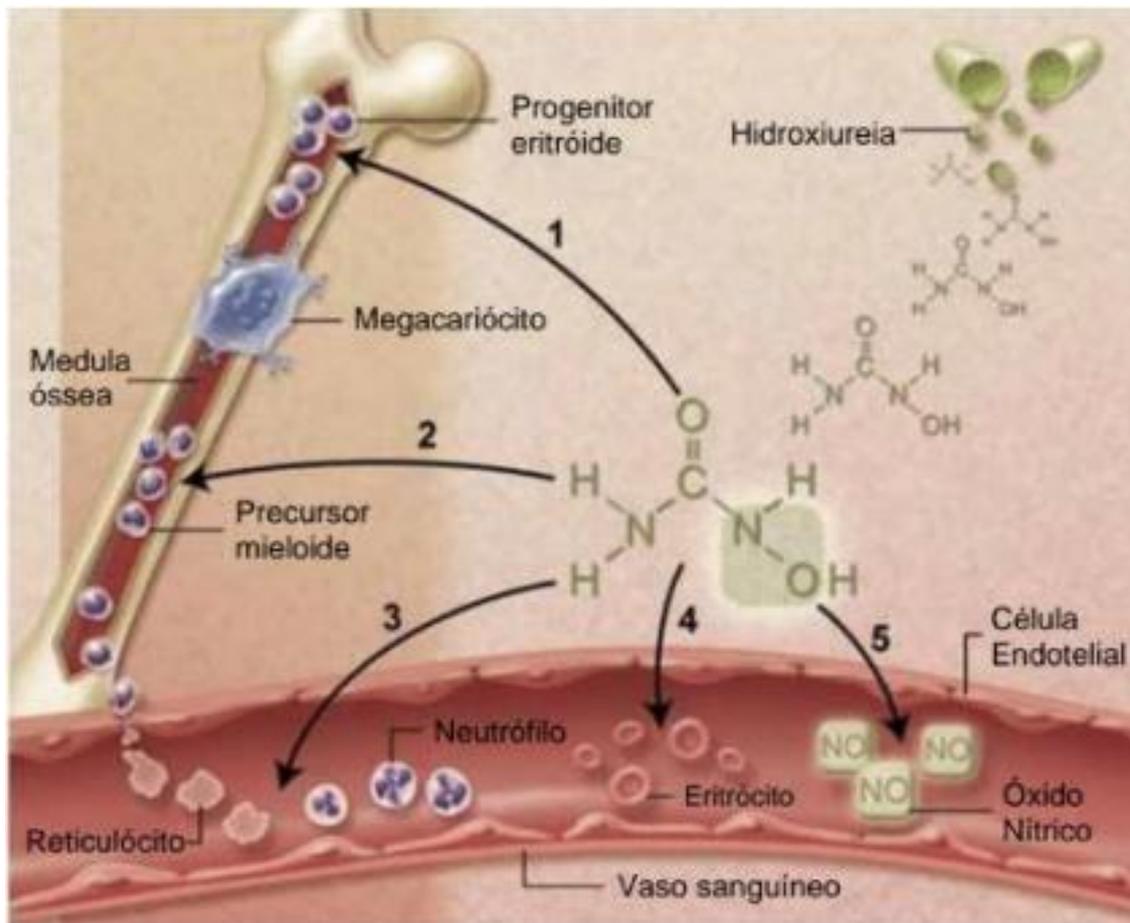


Figura 4: Efeitos benéficos da HU na Anemia Falciforme.

1) Indução da HbF por ativação enzimática; 2) baixas quantidades de neutrófilos e reticulócitos por inibição da ribonucleotídeo redutase; 3) diminuição da agregação e melhora na reologia dos neutrófilos; 4) diminuição da hemólise por hidratação do eritrócito; 5) o óxido nítrico (NO) é liberado melhorando a resposta vascular.

Fonte: Adaptado de (WARE, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1- Geral

Caracterizar molecularmente as regiões promotoras dos genes IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 e TNF- α em pacientes portadores de Anemia Falciforme com e sem tratamento com Hidroxiureia e em um grupo controle saudável.

3.2- Específicos

- Quantificar os níveis das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 e TNF- α nos pacientes e controles;
- Descrever e caracterizar a concentração das citocinas nos diferentes estados clínicos dos pacientes falcêmicos;
- Identificar e descrever a frequência dos polimorfismos nas regiões promotoras dos genes inflamatórios nos pacientes e controles;
- Analisar possíveis correlações dos polimorfismos encontrados com as concentrações das citocinas inflamatórias nos pacientes e controles;
- Analisar como os polimorfismos concomitantemente com os níveis de citocinas modulam a clínica nos pacientes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

O modelo de estudo baseou-se em um estudo Caso-controle com o grupo CASO constituído de pacientes portadores de AF e um grupo CONTROLE constituído de indivíduos saudáveis (doadores de sangue).

4.2 Aspectos Éticos

As amostras utilizadas nesse projeto foram provenientes de três projetos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOAM (CEP-HEMOAM), com anuência da instituição intitulados “Potenciais Biomarcadores Celulares e Solúveis Associados a Diferentes Haplótipos e Fenótipos de Anemia Falciforme” com nº de parecer: 1.864.640; “Marcadores de Ativação da Inflamação da Doença Falciforme” com nº de parecer: 2.478.469 ”Associação dos polimorfismos do óxido nítricoendotelial Sintetase, endotelina-1, tgf beta e trombospondina-1 em riscos Vascularesna doença falciforme” com nº de parecer: 2.790.764

4.3 Áreas de Estudo

A população do estudo de ambos grupos casos e controles residem na capital de Manaus e interior do Amazonas, visto que, a Fundação HEMOAM é responsável por ofertar o diagnóstico e tratamento em todo o Estado.

4.4 Amostragem

Foram incluídos 214 pacientes portadores de AF com e sem tratamento com hidroxiuréia, durante atendimento ambulatorial realizado periodicamente na HEMOAM, enquanto o grupo controle, um total de 240 doadores convidados no momento da triagem aceitaram participar do estudo. Havendo concordância de participação, ambos casos e controles, assinaram do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

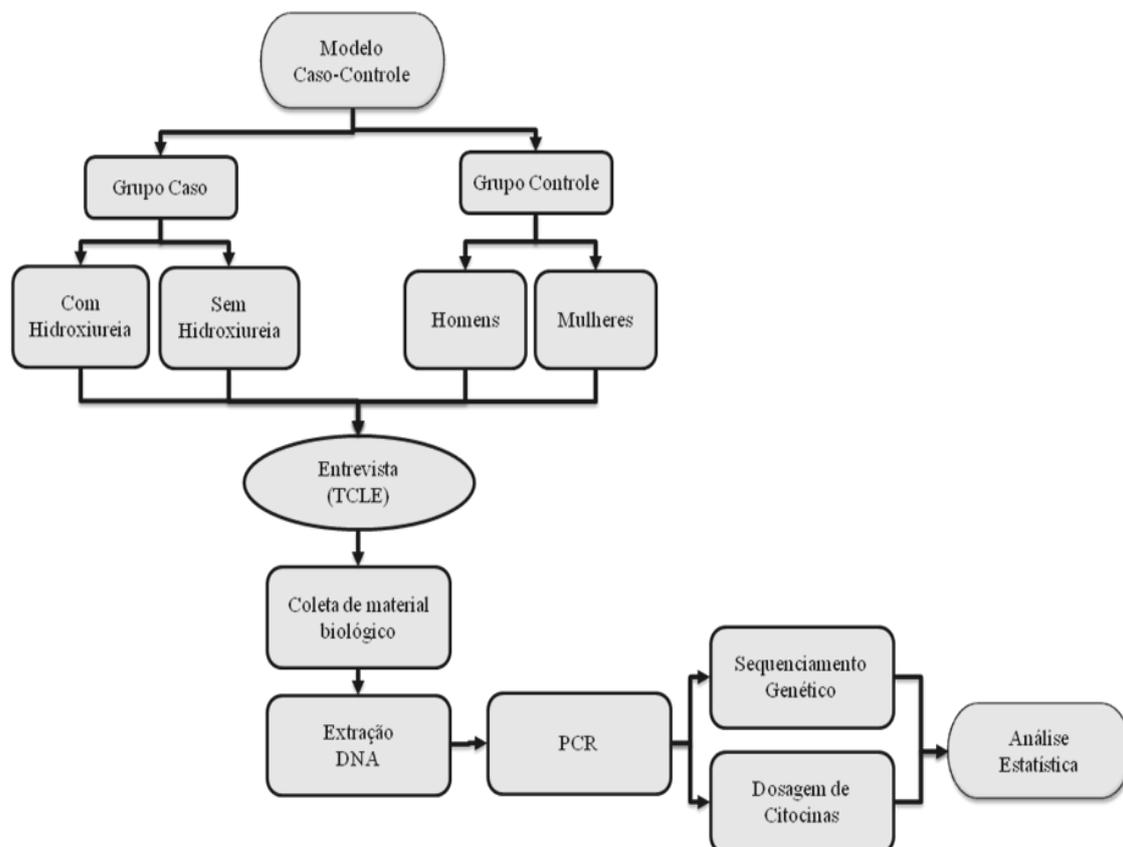
4.5 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídos no estudo indivíduos de ambos os sexos, independente de idade, etnia, ancestralidade, e no caso dos pacientes com AF, independente de doenças pré-existentes, profilaxia medicamentosa, uso de hidroxiuréia e transfusões sanguíneas.

Foram excluídos do estudo somente os pacientes que apresentassem sorologia positiva para HIV, HTLV, Hepatites e qualquer outra infecção que elevasse a gravidade do paciente, enquanto àqueles doadores onde sua bolsas doadas seriam automaticamente descartadas.

4.6 Fluxograma de atividades

A Figura 7, resume as atividades do projeto desde o seu início, com entrevistas aos participantes do grupo caso e do grupo caso-controle, até o processamento dos dados com a análise estatística.



4.7 Coleta de Material Biológico

Todos os participantes da pesquisa foram submetidos a uma punção venosa para coleta de 5mL de sangue periférico em tubo contendo anticoagulante EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético). Após coletadas, as amostras foram armazenadas alicotadas e encaminhadas para serem armazenadas em freezers -80°C para preservação do plasma para dosagens posteriores das citocinas e extração do material genético no Laboratório de Análises Especializadas em Hematologia e Biologia Molecular (LAEBM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM.

4.8 Dosagem das citocinas

Para a análise das citocinas foi usado o *BDTM Cytometric Bead Array (CBA) System*, com os KITS obtidos da empresa BD Biosciences®. Para as dosagens das citocinas do estudo, foram utilizados dois KITS: *O CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokines e CBA Human Inflammatory Cytokines*. Todas as dosagens plasmáticas das citocinas foram realizadas no Instituto Osvaldo Cruz-FIOCRUZ-Bahia (Plataforma de Citometria de Fluxo) utilizando o Citômetro de Fluxo BD Symphony S6.

4.9 Extração de DNA

Para as análises moleculares, o DNA genômico foi isolado de leucócitos a partir de 200µL de sangue, utilizando-se o método direto *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen), conforme protocolo do fabricante.

4.10 Amplificação Gênica

As amplificações das regiões promotoras foram realizadas através da técnica da Reação da polimerase em cadeia (PCR) com primers específicos para cada citocina escolhida, conforme quadro abaixo:

Quadro 2. Descrição dos primers utilizados para amplificação das regiões promotoras das citocinas.

Citocina	Sequencia dos Primres	Tamnhio Fragmento (pb)
IL-1B	D: 5' - CAT CCA TgA gAT Tgg CTA g - 3' R: 5' - AgC ACC TAg TTg TAA ggA Ag - 3'	719
IL-6	D: 5' - TgA ggC TAg CgC TAA gAA gC - 3' R: 5' - CTg ggA ggA TTC CCA Agg - 3'	546
IL-8	D: 5' - AgT CCA CAg ACC ACA AAg CA- 3' R: 5' -TCg CAA TAT AAg TTT CTg ATg gCT T-3	693
IL-10	D: 5` - ggT TTC CCg gCA CAg gAT T - 3` R: 5` - TTg ggA Agg ggA AgT Agg gAT - 3`	987
IL-18	D: 5' - CTT TgC TAT CAT TCC Agg AA - 3' R: 5' - Agg Agg gCA AAA TgC ACT gg - 3'	839
TNF-α	D: 5' - TgA AAC CAg CAT TAT gAg T - 3` R: 5' - AAC AAC TgC CTT TAT ATg TC - 3'	680

D: Direto

R: Reverso

Posteriormente foi realizada a purificação dos produtos amplicados através do kit *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent- thermofisher*.

4.11 Sequenciamento genético

A técnica molecular empregada para o sequenciamento gênico foi o de SANGER (SANGER et al., 1977). Para esta metodologia, foi utilizado Sequenciador Automático Applied Biosystems™ 3500, utilizando-se o *Kit BigDye 03 TM (Terminator Sequencing Standard- Applied Biosystems)*.

Para o estudo das regiões promotoras das citocinas estudadas foram realizadas quatro (4) amplificações pela técnica de PCR convencional para cada amostra, sendo duas (2) utilizando Primers Diretos e duas com Primers Reversos.

Todos os produtos amplicados foram purificados para realização do sequenciamento gênico, utilizando-se a metodologia *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermofisher)*.

A reação de sequenciamento foi realizada em placas *MicroAmp 96-well Reaction*

Plate (Applied Biosystems), utilizando-se 1,0 µl de Big Dye Terminator, 1,0 µl de primer (2,0 pmol), 2,0 µl de tampão (Tris-Cl 200mM pH 9,0: 5 mM MgCl₂), 2,0 µl DNA (aproximadamente 100 a 200 ng da PCR purificada) e 4,0 µl de H₂O (Ultra Pura – UNISCIENCE-Brasil), totalizando 10 µl do MIX final. As reações foram incubadas em Termociclador com Gradiente (*TurboCycler Lite*), na temperatura inicial de 96°C durante 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 96°C por 40 segundos; 52°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos.

Ao final da amplificação, em cada poço foram adicionados 10,0 µl de H₂O milli-Q autoclavada e 30 µl de etanol absoluto (*Sigma-Aldrich*) a 100%, com posterior homogeneização aproximadamente 30 vezes por inversão. Após homogeneização, a placa foi incubada por 30 minutos no escuro a temperatura ambiente, seguida de centrifugação por 25 minutos a 3500 xg, descartando-se o sobrenadante, com posterior *spin* invertido a no máximo 100 xg. Esta etapa foi seguida com adição de 100,0 µl de etanol (*Sigma-Aldrich*) a 70% e homogeneização por 30 vezes, com posterior centrifugação por 10 minutos a 3500 xg à temperatura ambiente, sendo esta etapa repetida 2 vezes.

Ao final das repetições, as placas foram incubadas em ambiente escuro por período mínimo de 2 horas, com posterior acréscimo de 12,0 µl de *Hi-DiTM Formamide*(*Applied Biosystems*) e então sequenciadas a seguir.

4.12 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas nos programas *SPSS vs21* e *Prism vs5*. Os valores de $p < 0,05$ serão considerados significativos.

5. RESULTADOS

ARTIGO

**POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH CLINICAL PROGRESSION AND
EXPRESSION OF INFLAMMATORY INTERLEUKINS IN SICKLE CELL
ANEMIA PATIENTS.**

A ser enviado

BLOOD TRANSFUSION

ISSN:1723-2007

INTRODUCTION

Hemoglobinopathies are the most common group of genetic diseases worldwide. They are related to hemoglobin synthesis, are generally inherited in an autosomal recessive manner and are characterized by reduced synthesis of hemoglobin globin chains (TRAEGER & HARTEVELD, 2017; FAES et al., 2018).

Hemoglobin is responsible for transporting oxygen (O₂) and carbon monoxide (CO₂) gases in the body. In the normal state, human hemoglobin has three variants: A1 (HbA1), A2 (HbA2), and fetal hemoglobin (HbF). HbA1 is composed of 2 α globin chains and 2 β chains, while HbA2 consists of 2 α and 2 δ and HbF consists of 2 α and 2 γ . HbF has a high affinity for O₂ compared to HbA1 and HbA2 and is the dominant hemoglobin until approximately 6 months of life, later replaced by HbA1, which becomes predominant in 90 to 95% of individuals (LICTHMAN et al., 2017). Among hemoglobinopathies, Sickle Cell Anemia (SCA) is the most prevalent worldwide and results from a point mutation at position 6 of the β -globin gene, leading to the replacement of the amino acid glutamic acid by valine. This modification alters HbA1 to variant hemoglobin S (HbS) (SUNDD et al., 2019; WEATHERALL & PROVAN, 2000). Individuals who inherit this genetic mutation in only one gene are carriers of the sickle cell trait (HbAS) and usually do not manifest symptoms. However, individuals who carry two mutant genes have the homozygous form (HBSS) and present severe symptoms (REES et al., 2022).

The HbS variant, when subjected to low O₂ tension, forms polymers inside red blood cells, making them rigid and changing their biconcave shape to a “sickle” shape, a factor that hinders transit in the microcirculation, causing adhesion to the vascular endothelium and consequently contributing to vaso-occlusive crises (VOC) and tissue ischemia.

Patients with this clinical condition show intense pain and high hypoxia, causing chronic damage to organs and even premature death of carriers (ARCHER, 2015; SUNDD et al., 2019).

The main events in the pathophysiology of AF are hemolysis and CVOs that occur due to the complex phenomenon of HbS polymerization, essential for the occurrence of the disease, this is due to the release of cellular components of hemoglobin with the rupture of the erythrocyte, therefore (EMBURY et al., 1995; ZAGO 2007; COSTA et al., 2013; KATO et al., 2018).

The polymerization of the HbS molecule inside erythrocytes is the pillar in the pathogenesis of the disease and its complications, and the higher the HbS content, the more severe the patient's clinical condition (EATON, 2020). Recurrent painful crises are associated with autoinflammatory conditions accompanied by an increase in the concentration of innate immune cytokines. The inflammatory environment of AF promotes the activation of the platelet inflammasome, through inflammatory cytokines that activate peripheral nerve receptors, causing peripheral sensitization and hyperalgesia (REES et al., 2022). Several studies describe inflammatory molecules with high levels in SCA, especially TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), and Interleukins (IL): IL-1 β , IL-8, IL-6 and some anti-inflammatory proteins such as IL-10, the latter of which is elevated precisely to limit the production of inflammatory molecules (TOZATTO et al., 2020). Although inflammation plays an important role in the pathophysiology of the disease, the inflammatory pathways involved in the complications are not yet fully understood. This chronic inflammatory state directly participates in several clinical conditions observed in patients (FRENETTE, 2002; ALAGBE, 2022).

According to the Ministry of Health, in the period from 2014 to 2020, the annual average of new cases of SCA in children was 1,087, with an incidence of 3.78 per 10,000 live births. It is assumed that there are at least 100,000 patients with SCA in the country, and it is still considered a public health problem due to the high prevalence of morbidity and mortality in the population (SANTOS et al., 2021; MS, 2022).

The main pharmacological treatment for patients with SCA is Hydroxyurea (HU), also known as hydroxycarbamide, which is an antineoplastic drug and has an action in increasing the concentration of HbF in red blood cells, improving erythrocyte-endothelium interaction and erythrocyte density (MILLER et al., 2010). In addition, HU significantly reduces the absolute number of neutrophils, monocytes, and reticulocytes in peripheral blood (CHARACHE et al., 1996; WARE et al., 2016). HU significantly reduces pro-inflammatory cytokines and inhibits the inflammatory process in tissues after reperfusion ischemia (LANARO et al., 2006; ZHU et al., 2015).

This study aimed to evaluate the effect of HU therapy on the expression of inflammatory cytokines, in addition to molecularly characterizing the promoter regions of the cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18 and TNF- α in patients with and without HU treatment and in a healthy control group (blood donors), in an attempt to identify possible polymorphisms that are concomitantly correlated with HU and with the modification of the expression of inflammatory cytokines involved in the comorbidities of these patients.

MATERIALS AND METHODS

Ethical statement

The samples used came from three studies submitted and approved by the Research Ethics Committee of the HEMOAM Foundation (CEP-HEMOAM), with the institution's consent, entitled “Potential Cellular and Soluble Biomarkers Associated with Different Haplotypes and Phenotypes of Sickle Cell Anemia” with opinion number: 1,864,640; “Inflammation Activation Markers of Sickle Cell Disease” with opinion number: 2,478,469; and “Association of polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase, endothelin-1, tgf beta and thrombospondin-1 in vascular risks in sickle cell disease” with opinion number: 2,790,764.

Participants and samples

A total of 214 patients with SCA with and without HU treatment were included during outpatient care provided periodically at HEMOAM, and a healthy control group of 240 blood donors invited at the time of screening. If they agreed to participate, both cases and controls signed the Informed Consent Form. All study participants underwent venipuncture to collect 5mL of peripheral blood in a tube containing EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) anticoagulant. After collection, the samples were stored at -80°C to preserve cytokines in the Laboratory of Specialized Analysis in Hematology and Molecular Biology (LAEBM) at the School of Pharmaceutical Sciences at UFAM, for later DNA extraction and molecular analysis.

DNA Extraction

To begin molecular analyses, genomic DNA was isolated from leukocytes from 200µL of blood, using the direct method QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol.

DNA Amplification

Amplifications of the promoter regions were performed using the polymerase chain reaction (PCR) technique with specific primers for each chosen cytokine (Chart 1).

Subsequently, the amplified products were purified using the ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent- thermofisher kit.

Chart 1. Description of the primers used to amplify the cytokine promoter regions.

Cytokine	Primer sequence	Fragment size (bp)
IL-1B	D: 5' - CAT CCA TgA gAT Tgg CTA g - 3' R: 5' - AgC ACC TAg TTg TAA ggA Ag - 3'	719
IL-6	D: 5' - TgA ggC TAg CgC TAA gAA gC - 3' R: 5' - CTg ggA ggA TTC CCA Agg - 3'	546
IL-8	D: 5' - AgT CCA CAg ACC ACA AAg CA- 3' R: 5' -TCg CAA TAT AAg TTT CTg ATg gCT T-3	693
IL-10	D: 5` - ggT TTC CCg gCA CAg gAT T - 3` R: 5` - TTg ggA Agg ggA AgT Agg gAT - 3`	987
IL-18	D: 5' – CTT TgC TAT CAT TCC Agg AA - 3' R: 5' – Agg Agg gCA AAA TgC ACT gg - 3'	839
TNF- α	D: 5' – TgA AAC CAg CAT TAT gAg T - 3` R: 5' – AAC AAC TgC CTT TAT ATg TC - 3'	680

F: Forward R: Reverse

Cytokine assay

Cytokines in both groups were assayed with xx mL of plasma using the Luminex technique (The Bioplex-Pro Human Cytokine 27-Plex Kit from Bio-Rad), following the manufacturer's protocol and recommendations.

Genetic sequencing

Genetic sequencing was performed using the SANGER method on an Applied Biosystems™ 3500 Automatic Sequencer using the BigDye 03 TM Kit (Terminator Sequencing Standard - Applied Biosystems).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the SPSS vs21 and Prism vs5 programs. P values <0.05 were considered significant.

RESULTS

A total of 214 patients (HbSS) and 240 healthy controls (blood donors) (HbAA) participated in the study. Females were the majority among patients (62.15%), while males were more prevalent among controls (74.17%). Brown race was predominant in both patient (69.16%) and blood donor (72.5%) groups. The mean age of patients was 6.23 ± 8.51 , while that of donors was 32.2 ± 13 years old. All study participants resided in the state of Amazonas, distributed between the capital and inland municipalities. Other demographic data are presented in Table 1.

Table 1. Demographic data of the study population from HEMOAM.

DEMOGRAPHIC DATA	SCA PATIENTS (N=214) (%)	CONTROLS (N=240) (%)
Gender		
Male	81 (37.85)	178 (74.17)
Female	133 (62.15)	62 (25.73)
Ethnicity group		
Brown	148 (69.16)	174 (72.5)
Black	9 (4.21)	21 (8.75)
White	57 (26.63)	45 (18.75)
Diagnostic Age (Years) \pm SD (HbSS)	6.23 ± 8.51	---
Mean Age (Years) \pm SD Blood Donors	---	32.2 ± 13
Weight (Kg) \pm SD	41.40 ± 16.51	74.23 ± 27.41
Height \pm SD	153.75 ± 22.89	169.91 ± 26.58
BMI \pm SD	18.63 ± 3.78	27.06 ± 5.64
Years of Use \pm SD	4.89 ± 2.32	---

SD: Standard Deviation

HU: Hydroxyurea

BMI: Body Mass Index

Table 2 shows all clinical events that occurred in patients during the study, with the most prevalent and characteristic comorbidity of the disease being VOCs (85.2%), followed by hospitalizations (64.2%), lower limb pain (55.6%) and abdominal pain (40%) respectively. Of the total of 214 patients, 56 had demographic, hematological and clinical data verified before and after treatment with hydroxyurea for at least 12 months.

Regarding the hematological and biochemical data of the study population, as expected, there were numerous significant differences for both hematological and biochemical data, as well as markers for hemolysis, with the exception of urea and creatinine, as shown in Table 3.

Table 2. Frequency and Correlation of clinical events with and without Hydroxyurea Treatment in SCA patients from HEMOAM

Clinical Events	Frequency N=214 (%)	Frequency N=56 (%)		p-value
		Before HU	HU Treatment	
VOC	182 (85.05)	78.57	19.64 ↓↓↓↓	<0.001
Internations	132 (64.01)	71.43	50.0 ↓↓	<0.001
Lower Limb Pain	119 (55.61)	57.14	39.28 ↓↓	<0.001
Infections	91 (42.51)	39.28	37.5 ↓	0.871
Abdominal Pain	86 (40.19)	32.14	26.78 ↓↓	<0.001
Biliary Lithiasis	76 (35.51)	26.78	16.07 ↓↓	<0.001
Cholecystectomy	55 (25.70)	25.0	19.64 ↓	0.156
Upper Limb Pain	52 (24.29)	26.79	16.07 ↓	0.038
Joint Pain	50 (23.36)	28.57	16.07 ↓	0.029
SSC	45 (21.02)	28.57	14.28 ↓↓	<0.001
Chest Pain	44 (20.56)	16.07 ↓	19.64	0.786
Myalgia	41 (19.16)	37.50	21.42 ↓↓	<0.001
Sore Throat	40 (18.69)	12.5	10.71 ↓	0.924
Splenectomized	38 (17.76)	8.92	8.92	1000
Bone Alterations	30 (14.01)	17.86	16.07 ↓	0.893
Stroke	23 (10.75)	8.92	5.35 ↓	0.437
MMU	17 (7.94)	7.14	3.57 ↓	0.728
Cardiac Alterations	16 (7.48)	5.35	5.35	1000
Priapism (Male)	5/81 (6.17)	5/56 (8.92)	3/56 (5.35) ↓	0.592
ATS	12 (5.61)	3.57 ↓	1.78	0.841
Retinopathy	5 (2.34)	---	---	---
Renal Failure	4 (1.87)	1.78 ↓	3.57	0.841

VOC: Vaso-occlusive crises

SSC: Splenic Sequestration Crises

MMU: Medial malleolus ulcer

ATS: Acute Thoracic Syndrome

HU: Hydroxyurea

Bold font indicates statistical significance

Table 3. Correlation of hematological and biochemical values data between patients with SCA and healthy controls from HEMOAM.

Hematological and Biochemical Data	SCA Patients (N=214)	Healthy Controls (N=240)	p-value
Erythrogram			
RBC X10 ⁶ /mm ³	2.91 ± 0.68	4.56 ± 0.52	<0.001
Hemoglobin g/dL	8.28 ± 1.50	14.89 ± 11.24	<0.001
Hematocrit %	23.96 ± 3.45	43.89 ± 2.41	<0.001
MCV (fL)	93.14 ± 12.11	88.38 ± 9.58	<0.001
MCH (pg)	30.81 ± 3.81	30.54 ± 2.90	0.526
MCHC (g/dL)	33.23 ± 2.06	34.25 ± 2.13	0.872
Reticulocytes (%)	8.56 ± 7.52	1.89 ± 1.03	<0.001
RDW (%)	21.87 ± 1.99	13.58 ± 2.40	<0.001
WBC X 10 ⁹ /L	8.69 ± 4.29	6.59 ± 3.89	0.004
Absolute Platelet count. X 10 ⁹ /L	417.4 ± 159.8	389.9 ± 89.51	0.035
Lipid and Glucose Status			
Total cholesterol, mg/dL	126.21 ± 25.53	154.53 ± 35.66	<0.001
HDL cholesterol mg/dL	41.58 ± 8.87	56.25 ± 13.12	<0.001
Triglycerides mg/dL	116.48 ± 58.12	125.41 ± 32.36	0.010
Glucose mg/dL	80.36 ± 14.22	95.42 ± 9.21	<0.038
Hemolysis			
Total bilirubin mg/dL	4.78 ± 2.41	0.78 ± 0.23	<0.001
Direct bilirubin mg/dL	0.95 ± 1.26	0.59 ± 0.19	<0.001
Indirect bilirubin mg/dL	3.83 ± 1.15	0.19 ± 0.04	<0.001
GGT, mcg/dL	108.87 ± 59.21	38.56 ± 0.18	<0.001
Ferritin, ng/mL	758.1 ± 1154.9	219.57 ± 24.58	<0.001
LDH, U/L	601.1 ± 35.7	182.25 ± 65.89	<0.001
Renal			
Urea mg/dL	21.38 ± 11.48	25.20 ± 7.89	0.351
Creatinine mg/dL	1.05 ± 2.58	0.99 ± 0.89	0.759

N: Individuals count

SCA: Sickle cell anemia

WBC: White blood cell count

RBC: Red blood cell count

MCV: Mean corpuscular volume

LDH: Lactate dehydrogenase

MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration

RDW: Red blood cell distribution width

GGT: gamma-glutamyl transferase

MCH: Mean corpuscular hemoglobin

Two-way ANOVA test results

Figure 1 shows the cytokine levels among ACS patients and blood donors. As expected, there was a significant increase in cytokines in all patients in the study, with plasma concentrations approximately seven times higher, such as IL-6 in patients ($P<0.001$).

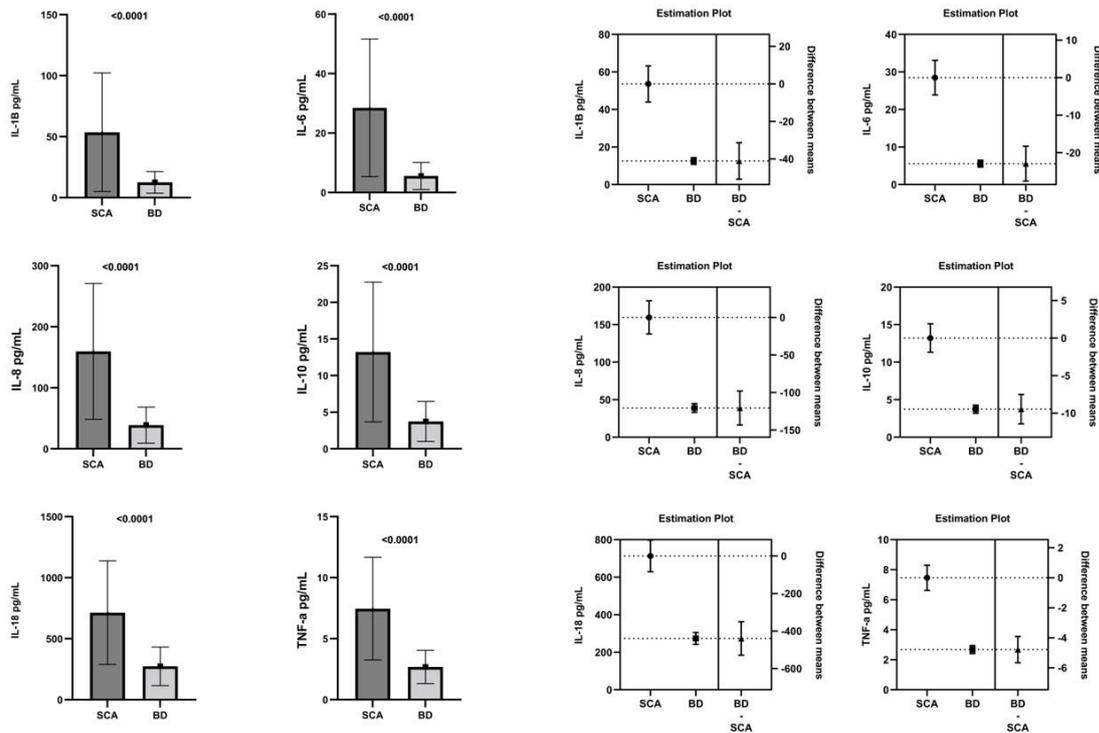


Figure 1: Plasma concentrations of cytokines among SCA Patients and study controls.

SCA: Sickle Cell Anemia

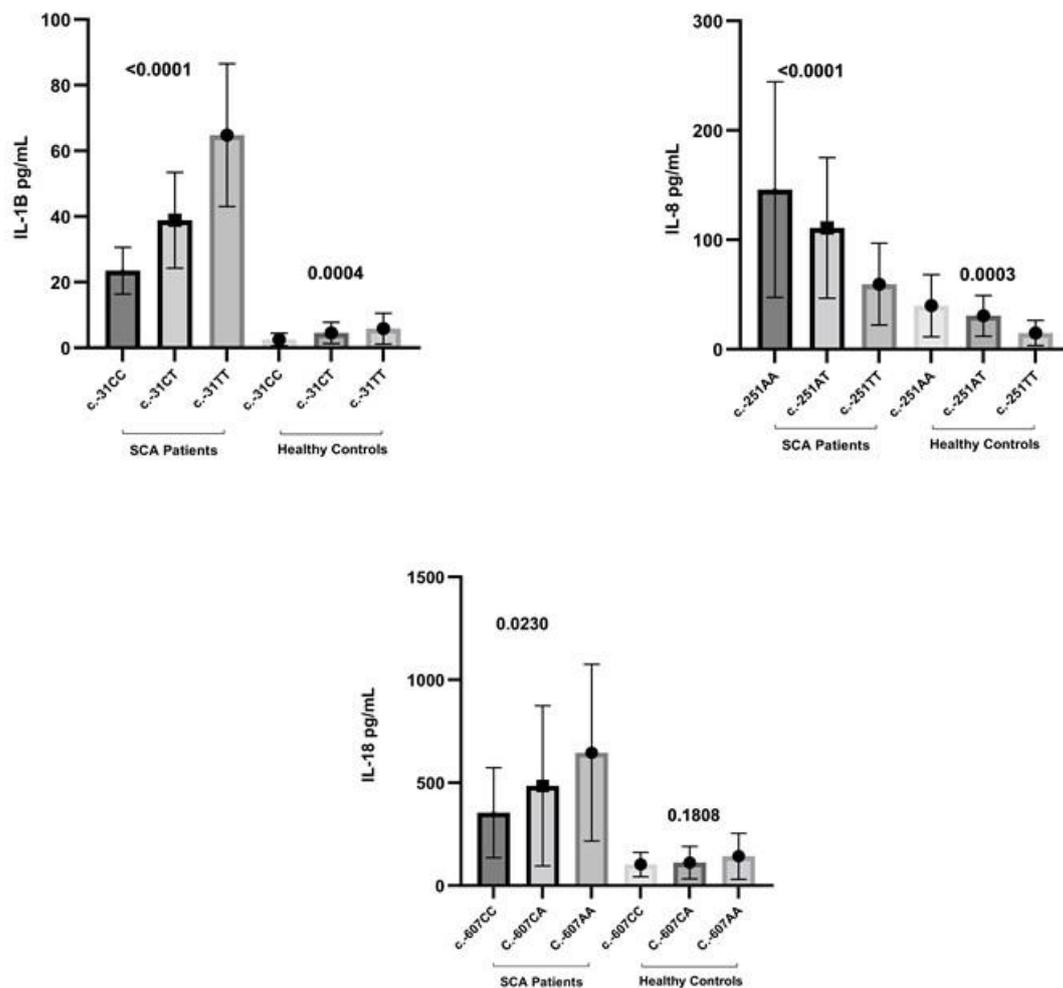
BD: Blood Donors

Table 4 shows the correlation of the main genotypes found in the study between patients and donors, as well as between patients with and without HU use. Significantly higher frequencies for the wild genotypes c.-31CC (IL-1B), c.-251AA (IL-8) and c.-607CC (IL-18) were found in blood donors when compared to patients. When these genotypes were associated between patients with and without HU use, only the wild genotype c.-251AA (IL-8) was significantly more frequent in those without HU use ($p=0.004$ – OR: 0.22 – CI: 0.07-0.66), presenting itself as a protective biomarker, since high serum concentrations of IL-8 have been observed in individuals with intense vaso-occlusive crisis, an important clinical aspect of the pathogenesis of sickle cell anemia.

Table 4. Correlation of cytokines genotypes between SCD patients and healthy controls and between with and without Hydroxyurea treatment.

GENE Polymorphism dbSNPs	SCA Patients N=100 (%)	Healthy Controls N=100 (%)	p-value OR (IC)	SCA Patient Hydroxyurea treatment		p-value OR (IC)
				YES (70)	NO (30)	
IL-1 β c.-31 C>T rs1143627	CC (68)	CC (52)	0.030 1.96 (1.10-3.48)	CC (48)	CC (20)	0.852
	CT (20) + TT (12)	CT (41) + TT (7)		CT (14) + TT (8)	CT (6) + TT (4)	1.09 (0.43-2.71)
IL-1 β c.-511 T>C rs16944	TT (55)	TT (45)	0.203	TT (37)	TT (16)	0.71
	TC (30) + CC (15)	TC (35) + CC (20)	1.49 (0.86-1.64)	TC (21) + CC (12)	TC (9) + CC (3)	0.84 (0.35-2.03)
IL-6 c.-174 G>C rs1800795	GG (69)	GG (61)	0.299	GG (45)	GG (24)	0.119
	GC (27) + CC (4)	GC (31) + CC (8)	1.42 (0.79-2.55)	GC (21) + CC (4)	GC (6) + CC (0)	0.45 (0.16-1.24)
IL-6 c.-572 G>C rs1800796	GG (77)	GG (72)	0.417	GG (55)	GG (22)	0.568
	GC (22) + CC (1)	GC (24) + CC (4)	1.30 (0.69-2.46)	GC (15) + CC (0)	GC (7) + CC (1)	1.33 (0.49-3.58)
IL-8 c.-251 A>T rs4073	AA (17)	AA (31)	0.020 0.45 (0.23-0.89)	AA (7)	AA (10)	0.004
	AT (49) + TT (34)	AT (48) + TT (21)		AT (40) + TT (23)	AT (9) + TT (11)	0.22 (0.07-0.66)
IL-10 c.-592 C>A rs1800872	CC (44)	CC (51)	0.396	CC (30)	CC (14)	0.725
	CA (50) + AA (6)	CA (39) + AA (10)	0.75 (0.43-1.31)	CA (38) + AA (2)	CA (12) + AA (4)	0.86 (0.36-2.02)
IL-10 c.-819 C>T rs1800871	CC (42)	CC (38)	0.564	CC (29)	CC (13)	0.817
	CT (46) + TT (12)	CT (44) + TT (18)	1.18 (0.67-2.08)	CT (32) + TT (9)	CT (14) + TT (3)	0.92 (0.39-2.19)
IL-18 c.-137 C>G rs187238	CC (54)	CC (48)	0.396	CC (40)	CC (14)	0.335
	CG (38) + GG (8)	CG (46) + GG (6)	1.27 (0.73-2.21)	CG (26) + GG (4)	CG (12) + GG (4)	1.52 (0.64-3.59)
IL-18 c.-607 C>A rs1946518	CC (25)	CC (39)	0.034	CC (18)	CC (7)	0.801
	CA (51) + AA (24)	CA (40) + AA (21)	0.52 (0.28-0.95)	CA (42) + AA (10)	CA (9) + AA (14)	1.13 (0.42-3.09)
TNF-a c.-308 G>A rs1800629	GG (68)	GG (74)	0.436	GG (51)	GG (17)	0.112
	GA (28) + AA (4)	GA (23) + AA (3)	0.75 (0.41-1.38)	GA (17) + AA (2)	GA (11) + AA (2)	2.05 (0.84-5.01)

The Figure 2 shows the plasma concentrations of cytokines among the genotypes that presented significant associations for patients and controls in the study. For the cytokine IL-1B, the mutant genotype c-31TT presented significantly higher concentrations regardless of whether they were patients or controls. The mutant genotype c.-607AA (IL-18) presented elevated concentrations in both groups, but significantly elevated only in patients. The mutant genotype c.-251TT (IL-8) presented significantly decreased concentrations in both study groups.



DISCUSSION

The variant hemoglobins “S”, “C” and “D” are the most prevalent in the world. In Brazil, it is estimated that there are approximately two million carriers of HbS alone, with approximately 50 thousand carriers of the homozygous HbSS genotype (MS, 2021). Brazil has high panmixia and a large degree of ethnic mixtures, in addition to mainly European, African and Amerindian roots, a factor that has resulted in the enormous heterogeneity of these data (JULIÃO, 2019). Currently, it is assumed that in Brazil, one in six newborns have variant structural hemoglobins (POMPEO et al., 2022). Our results demonstrated that females were more prevalent in patients with AF, corroborating regional studies and studies from other Brazilian states (XEREZ et al., 2023; SILVA et al., 2021).

These studies highlight the higher prevalence of AF in women, a factor that, according to SOUSA et al. (2021), can be justified due to men's low adherence to health services and adequacy to treatment, or even according to NASCIMENTO et al. (2023), in a study carried out in the city of São Paulo-Brazil only in male patients, it highlighted several reasons why men may neglect treatment, such as the fact that they are still family providers, need to keep their jobs and, due to the complexity of the disease, they constantly need to be monitored by health professionals, being absent from their work activities. Another factor that may influence this is the social stigmas that are still imposed by society regarding strength, virility and invulnerability, and with the fluctuations Due to the general well-being of these patients, many end up giving up because they know they will always be sick, often ignoring the symptoms.

As expected, among blood donors, the male gender was the most prevalent. Several studies in the national literature, such as the National Health Surveillance Agency (Anvisa), demonstrate in all Annual Bulletins that men represent between (56% and 78%) of all donations in National Blood Centers (ANVISA, 2022). DELATORRE et al., (2021) in their study in the state of São Paulo-Brazil showed that (52.8%) of blood donors were male. Studies carried out in other countries also found similar results, such as LI et al., (2021) who stated in their study in Nanjing-China that the majority of donors were men (53.9%). VHANDA et al., (2021) in a study carried out in Zimbabwe-Africa identified that the male gender was predominant among donors (57%). However, in a systematic review study carried out by MARTÍN SANTANA & MELIÁN ALZOLA (2022) in Spain indicated a higher prevalence of the female gender (52.8%).

Regarding race, in our study the most prevalent was the brown race (69.16%). It is

worth noting that the race of the research participants was self-declared. The results of NASCIMENTO et al., (2022) in patients from Rio de Janeiro-Brazil corroborated our results, which found that the brown race was present in (78.73%) of the cases, unlike a study published by ILERHUNMWUWA, (2023) in the United States, which demonstrated that the majority of patients were black (93.4%). Our results on the diagnostic age in patients with AF clearly demonstrate an agreement with the literature, in which the average age is 6.23 ± 8.51 years old. A study by KAPONDA et al., (2024) in the Democratic Republic of the Congo-Africa, carried out with 818 patients with AF, identified that the average of patients between 5 and 15 years old was the majority in the study, as well as FALEIROS et al., 2023, which showed in their study carried out in Minas Gerais-Brazil that the average diagnosis was 6.5 years old.

The average age of blood donors in our study (32.2 ± 13.0 years) corroborates several other national studies (MARIANO et al., 2013; CONCEIÇÃO et al., 2016; LOCKS et al., 2019). In Brazil, the average age of blood donors is over 29 years old, with the majority (66.7%) (ANVISA, 2022). An age close to that of our study has also been described in several other studies worldwide (GREINACHER et al., 2010; KASRAIAN & TAVASSOLI, 2010; LI et al., 2021; MOHAMUD et al., 2022).

The use of hydroxyurea began in Brazil in the 1980s and is currently recommended and regulated by the Ministry of Health from 9 months of age. It is a widely used drug and is the standard treatment to prevent VOCs and other symptoms in SCA. When administered early, before 2 years of age, it can prevent long-term impairment related to the progression of the disease (BANDEIRA et al., 2004; MS, 2024). The mean age at which HU was initiated in our study patients was 4.89 ± 2.32 years, corroborating several other national and international studies (YAWN et al., 2014; DOS SANTOS NERES et al., 2023; PANDEY et al., 2023; KHARGEKAR. et al., 2024). Patients with SCA present a heterogeneous clinical picture with a wide variety of symptoms, including occlusive crises and intense hemolysis (KATO, 2018; HADDAD et al., 2024; TSUKAHARA) et al., 2024. Our results corroborate other studies confirming VOCs as the main clinical symptoms present in patients in all age groups (KAPONDA et al., 2024). Abdominal pain crises were also highlighted in our study in (40%) of the patients, corroborating ARLET et al. (2021), who demonstrated that CVOs can easily be confused with several other symptoms of digestive disorders.

The hematological data demonstrated in our study are quite variable in comparison with several other studies, justified by the heterogeneous hemolysis present in the disease. The reduction in red blood cell, hemoglobin, hematocrit values, and an increase in the number

of reticulocytes, leukocytes, and RDW were quite significant. ADANHO et al. (2022) demonstrated similarity in the hematological and biochemical profile of patients in a study carried out in Bahia, showing a significant reduction in hemoglobin and hematocrit, an increase in the leukocyte count, reticulocytes, RDW, and indirect bilirubin. JUNIOR et al., (2020) showed a decrease in red blood cell, hemoglobin and hematocrit levels mainly in those who presented VOCs, with an increase in the total number of leukocytes compared to other patients in a state without VOCs.

Some studies describe markers for the severity of the disease such as leukocytosis, reticulocytosis, thrombocytosis and low concentration of red blood cells, as they indicate severe anemia in these patients (LALANNE-MISTRICH et al., 2018; VEIL et al., 2019). GARCIA et al., (2020) demonstrated patients with AF in a steady state, in crisis and healthy controls with HbAA, with results similar to those of our study, evidencing the hemolysis present in patients regardless of the state of the disease. The pathophysiology of SCA, characterized mainly by the activation of sickle red blood cells, elevation of reticulocytes, leukocytes, platelets and endothelial cells, is also characterized by the expression of several inflammatory molecules (DOMINGOS et al., 2020; FEUGRAY et al., 2024; LABARQUE & OKOCHA, 2024). As expected, we observed elevated levels of all cytokines in our study in patients, clearly justified by the constant inflammatory clinical manifestations in these patients, corroborating several other studies involving correlations with healthy donors and patients with SCA (APPIAH et al., 2024; KHURANA et al., 2024; LI et al., 2024). Although the polymorphisms found in our study have already been previously described in other studies involving patients with SCA, the correlations of genotypes in patients with and without HU use are described for the first time. The significantly higher prevalence of wild-type c.-31CC, c.-251AA, and c.-607CC genotypes found in both groups demonstrates that these SNPs are independent of the disease, exerting different expressions, and increasing mainly in inflammatory diseases. The wild-type c.-251AA (IL-8) genotype, significantly more prevalent in those without HU use ($p=0.004$ – OR: 0.22 – CI: 0.07-0.66), was shown to be a protective biomarker in individuals with intense vaso-occlusive crises, an important clinical aspect of the pathogenesis of sickle cell anemia. JUNIOR et al. (2020) evaluated the clinical impact of cytokines on the course of the disease, demonstrating high concentrations of IL-8 in patients with mild crises, corroborating our results.

Interleukin IL-1 β is a potent pro-inflammatory cytokine crucial for host defense responses to infections and injuries. Some studies involving patients with AF have reported elevated plasma levels, influencing the progression of the disease and elevation of the

exacerbated inflammatory state. In addition, other studies have associated IL-1B with the phenomena of vasocclusion, cell adhesion, signaling and coagulation (PATHARE et al., 2003; ELLIOT et al., 2007; AFIFIF et al., 2019; VATs et al., 2020; XEREZ ALBUQUERQUE et al., 2023).

Interleukin IL-18 is a cytokine associated with severe inflammatory events, including severe symptoms such as sepsis (CERQUEIRA et al., 2011; DUARTE et al., 2016; GUPTA et al., 2021). The finding in our study of a higher prevalence and high levels of IL-18 in the c-607AA mutant genotype in patients with AF corroborates several studies that favor the severity of the disease, which enables this SNP as an important inflammatory biomarker of risk in these patients, involving mainly cardiac comorbidities with a high mortality rate (ZHABYEYEV et al., 2021).

CONCLUSION

Mixed ethnicity was predominant in both groups; SCA patients (69.16%) and blood donors (72.5%), the most prevalent events in SCA patients were VOCs (85.2%), followed by hospitalizations (64.2%).

All cytokines were elevated in the SCA patients, with plasma concentrations approximately seven times higher than in controls.

Significantly higher frequencies for the wild-type genotypes c.-31CC (IL-1B), c.-251AA (IL-8) and c.-607CC (IL-18) were found in blood donors when compared to patients. The wild-type genotype c.-251AA (IL-8) was significantly more frequent in sickle cell patients without HU treatment.

The c.-31TT (IL-1B) mutant genotype showed significantly higher plasma concentrations, while the c.-251TT (IL-8) mutant genotype showed significantly lower plasma concentrations, regardless if SCA patient or control, the c.-607AA (IL-18) mutant genotype showed significantly higher concentrations in SCA patients.

REFERENCES

- ADANHO CSA, YAHOUÉDÉHOU SCMA, SANTANA SS. et al. Association of laboratory markers and cerebral blood flow among sickle cell anemia children. *Front. Pediatr.* 10:914466. doi: 10.3389/fped.2022.914466.
- AFIFI RAA, SEDKY YM, ABD-ELKAREEM H, et al. IL-1 β +3954 C/T Polymorphism and Its Clinical Associations in Egyptian Sickle Cell Disease Patients. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2019 Jan 1;13(1):35-41. PMID: 31205626; PMCID: PMC6557973.
- ALAGBE AE, JUSTO JUNIOR AS, RUAS LP, et al., Interleukin-27 and interleukin-37 are elevated in sickle cell anemia patients and inhibit in vitro secretion of interleukin-8 in neutrophils and monocytes. *Cytokine.* 2018 Jul;107:85-92. doi: 10.1016/j.cyto.2017.12.001.
- ANVISA. (2022). 9º Boletim de Produção Hemoterápica. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (Anvisa). <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias/anvisa/2022/anvisa-divulga-9o-boletim-de-producao-hemoterapica/BRASIL>. Acesso em: 10 jun 2024.
- APPIAH SK, NKANSAH C, ABBAM G, et al, Chukwurah EF. Molecular characterization of HAMP rs10421768 gene and phenotypic expression of hepcidin; a case-control study among sickle cell anaemia patients in Ghana. *PLoS One.* 2024 Jun 27;19(6):e0306194. doi: 10.1371/journal.pone.0306194. PMID: 38935685;
- ARCHER N, GALACTEROS F, BRUGNARA C. 2015 Clinical trials update in sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 2015 Oct;90(10):934-50. doi: 10.1002/ajh.24116
- ARLET, J.-B.; CHEMINET, G.; ALLALI, S. Les Crises Vaso-Occlusives de La Drépanocytose. *La Presse Médicale Formation Volume 2, Issue 4, October 2021, Pages 373-379* *Presse Méd. Form.* 2021, 2, 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.lpmfor.2021.08.013>.
- BANDEIRA, FMGC, PERES, JC, CARVALHO, EJ, et al.. (2004). Hidroxiuréia em pacientes com síndromes falciformes acompanhados no Hospital Hemope, Recife, Brasil. *Revista Brasileira De Hematologia E Hemoterapia*, 26(3), 189–194. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842004000300008>.
- CERQUEIRA BA, BOAS WV, ZANETTE AD, et al. Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. *Cytokine.* 2011 Nov;56(2):471-6. doi: 10.1016/j.cyto.2011.08.013.
- CHARACHE S, BARTON FB, MOORE RD, ET al. Hydroxyurea and sickle cell anemia. Clinical utility of a myelosuppressive "switching" agent. The Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *Medicine (Baltimore).* 1996 Nov;75(6):300-26. doi: 10.1097/00005792-199611000-00002.
- CONCEIÇÃO VM DA, ARAÚJO JS, OLIVEIRA RAA de, et al. Perceptions of donors and recipients regarding blood donation. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2016 Jul;38(3):220–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.05.006>.
- DELATORRE MV, BATALHA KM, SANTOS LD. et al. Demographics and serological

profile of blood donors who opt for the confidential unit exclusion in a blood bank in Sao Paulo, Brazil. *Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine. Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2021;63:e69. <https://doi.org/10.1590/S1678-99462021630689>.

DOMINGOS, IF, PEREIRA-MARTINS, DA, SOBREIRA, MJVC et al. High levels of proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8 are associated with a poor clinical outcome in sickle cell anemia. *Ann Hematol* 99, 947–953 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00277-020-03978-8>.

DOS SANTOS NERES JS, YAHOUÉDÉHOU SCMA, GONCALVES MS. Effectiveness of Pharmacokinetic-Guided Hydroxyurea Dose Individualization in Patients with Sickle Cell Anemia: A Mini-Review. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023 Jun 8;16(6):857. doi: 10.3390/ph16060857.

DUARTE JD, DESAI AA, SYSOL JR, 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*. 2016 Sep 16;11(9):e0163013. doi: 10.1371/journal.pone.0163013.

EATON WA. Hemoglobin S polymerization and sickle cell disease: A retrospective on the occasion of the 70th anniversary of Pauling's Science paper. *Am J Hematol*. 2020 Feb;95(2):205-211. doi: 10.1002/ajh.25687.

ELLIOTT L, ASHLEY-KOCH AE, DE CASTRO L, et al. Polimorfismos genéticos associados ao priapismo na doença falciforme. *Ir J Haematol*. 2007; 137(3):262-7.

EMBURY SH. Sickle cell disease. In: Hoffman R, Benz Junior EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE. *Hematology*. 2ª edição. New York: Churdhill Livingstone, p. 611-640, 1995.

FAES C, SPARKENBAUGH EM, PAWLINSKI R. Hypercoagulable state in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc*. (2018) 68:301–18. doi: 10.3233/CH-189013.

FALEIROS JQA., LINS JC, LOPES FTT. et al. Fever and sickle cell disease: clinical and epidemiological evaluation of patients treated in a reference tertiary hospital. *Rev. Interdisciplinar ciências médicas*. Vol. 7. 2023. Disponível em: <https://revista.fcmmg.br/index.php/RICM/article/view/274/196> . Acesso em: 14 jul. 2024.

FEUGRAY G, GRALL M, DUMESNIL C, et al. Lipid and hemolysis parameters predicting acute chest syndrome in adulthood with sickle cell disease. *Lipids Health Dis*. 2024 May 16;23(1):140. doi: 10.1186/s12944-024-02135-8.

FRENETTE PS. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol*. 2002 Mar;9(2):101-6. doi: 10.1097/00062752-200203000-00003.

GARCIA NP, JÚNIOR ALS, SOARES GAS, et al. Sickle Cell Anemia Patients Display an Intricate Cellular and Serum Biomarker Network Highlighted by TCD4+CD69+ Lymphocytes, IL-17/MIP-1β, IL-12/VEGF, and IL- 10/IP-10 Axis. *J Immunol Res*. 2020 Jan 8;2020:4585704.

GREINACHER A, FENDRICH K, HOFFMANN W. Demographic Changes: The Impact for

Safe Blood Supply. *Transfus Med Hemother.* 2010 Jun;37(3):141-148. doi: 10.1159/000313949. Epub 2010 May 20.

GUPTA A, FEI YD, KIM TY, et al. IL-18 mediates sickle cell cardiomyopathy and ventricular arrhythmias. *Blood.* 2021 Mar 4;137(9):1208-1218. doi: 10.1182/blood.2020005944.

HADDAD EN, KUMAR P, SHEARN-NANCE G, et al. Clinical Approach to Genetic Cerebral Arteriopathy in the Adult Patient with Ischemic Stroke. *Neurol Genet.* 2024 Aug 21;10(5):e200182. doi: 10.1212/NXG.000000000200182.

ILERHUNMWUWA NP, INYANG L, WASIFUDDIN M. et al. Demographics and outcomes of hemoglobin genotype in hospitalized patients with COVID-19 and sickle cell disease in the United States. *Eur J Haematol.* 2023 Oct;111(4):611-619. doi: 10.1111/ejh.14054.

JULIÃO A. Doenças falciformes ainda demandam atenção. *Jornal da Unicamp, Campinas*, p. 01-02, 23 abr. 2019. Disponível em: <https://www.unicamp.br/unicamp/index.php/ju/noticias/2019/04/23/doencasfalciformes-ainda-demandam-atencao> >Acesso em: 18 fev. 2023.

JUNIOR ALS, GARCIA NP, CARDOSO EC. et al. Immunological Hallmarks of Inflammatory Status in Vaso-Occlusive Crisis of Sickle Cell Anemia Patients. *Front. Immunol.* 12:559925. doi: 10.3389/fimmu.2021.559925.

KAPONDA A; MUYA K; PANDA J, et al. Unraveling the Complexity of Vaso-Occlusive Crises in Sickle Cell Disease: Insights from a Resource-Limited Setting. *J. Clin. Med.* 2024, 13, 2528. <https://doi.org/10.3390/jcm13092528>.

KASRAIAN L, TAVASSOLI A. Relationship between first-year blood donation, return rate for subsequent donation and demographic characteristics. *Blood Transfus.* 2012 Oct;10(4):448-52. doi: 10.2450/2012.0097-11.

KATO GJ, PIEL FB, REID CD, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2018 Mar 15;4:18010. doi: 10.1038/nrdp.2018.10.

KATO GJ, STEINBERG MH, GLADWIN MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest.* 2017 Mar 1;127(3):750-760. doi: 10.1172/JCI89741. Epub 2017 Mar.

KHARGEKAR N, BANERJEE A, ATHALYE S, et al. Role of hydroxyurea therapy in the prevention of organ damage in sickle cell disease: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev.* 2024 Feb 8;13(1):60. doi: 10.1186/s13643-024-02461-z.

KHURANA K, MAHAJAN S, ACHARYA S, et al. Clinical Biomarkers of Acute Vaso-Occlusive Sickle Cell Crisis. *Cureus.* 2024 Mar 18;16(3):e56389. doi: 10.7759/cureus.56389.

LABARQUE V, OKOCHA EC; International Hemoglobinopathy Research Network (INHERENT). Systematic Review of Genetic Modifiers Associated with the Development and/or Progression of Nephropathy in Patients with Sickle Cell Disease. *Int J Mol Sci.* 2024 May 16;25(10):5427. doi: 10.3390/ijms25105427.

LALANNE-MISTRICH ML, CONNES P, LAMARRE Y, et al. Lipid profiles in French west Indies sickle cell disease cohorts, and their general population. *Lipids Health Dis.* 2018 Mar 5;17(1):38. doi: 10.1186/s12944-018-0689-5.

LANARO C, FRANCO-PENTEADO CF, CONRAN N, SAAD ST, Costa FF. Anti-inflammatory effect of hydroxyurea therapy in sickle cell disease. *Blood* 2006; 108: 3806.

LI W, PUCKA AQ, DEBATS C, et al. Inflammation and autoimmunity are interrelated in patients with sickle cell disease at a steady-state condition: implications for vaso-occlusive crisis, pain, and sensory sensitivity. *Front Immunol.* 2024 Feb 1;15:1288187. doi: 10.3389/fimmu.2024.1288187.

LI Z, LEI S, LI X. et al. Blood Donation Fear, Perceived Rewards, Self-Efficacy, and Intention to Return Among Whole Blood Donors in China: A Social Cognitive Perspective. *Front Psychol.* 2021 Nov 22;12:683709. doi: 10.3389/fpsyg.2021.683709.

LOCKS MOH, SALUM NC, BARROS BS, et al. Profile of blood donors who presented adverse reactions to the donation. *Rev Bras Enferm* [Internet]. 2019;72(1):81-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0034-7167-2018-0305>.

LU JX, LU ZQ, ZHANG SL, et al. Correlation between interleukin-18 promoter -607C/A polymorphism and susceptibility to ischemic stroke. *Braz J Med Biol Res.* 2013 Jun;46(6):502-6. doi: 10.1590/1414-431X20132850.

MARIANO GISLON DA SILVA R, KUPEK E, PERES KG. Prevalência de doação de sangue e fatores associados em Florianópolis, Sul do Brasil: estudo de base populacional. *Cad Saúde Pública* [Internet]. 2013Oct;29(10):2008–16. Available from: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00174312>.

MARTÍN-SANTANA, J.D., MELIÁN-ALZOLA, L. The influence of service quality and anticipated emotions on donor loyalty: an empirical analysis in blood centres in Spain. *Health Care Manag Sci* 25, 623–648 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10729-022-09600-9>.

MILLER ST, WANG WC, IYER R, et al. BABY-HUG Investigators. Urine concentrating ability in infants with sickle cell disease: baseline data from the phase III trial of hydroxyurea (BABY HUG). *Pediatr Blood Cancer.* 2010 Feb;54(2):265-8. doi: 10.1002/pbc.22189.

Ministério da saúde. Doenças Falciformes (DF) e outras Hemoglobinopatias. (2021). Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saes/sangue/programa-nacional-da-triagem-neonatal/doencas-falciformes-df-e-outras-hemoglobinopatias>. Acesso em: 18 fev 2023.

Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Doença Falciforme. [s.l: s.n.]. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota Informativa No 268/2020.

Ministério da Saúde. Relatório de Recomendação Medicamento Hidroxiureia para o tratamento de pacientes com doença falciforme (SS, Sbeta0 e SD Punjab), entre 9 e 24 meses de idade, sem sintomas e complicações. Brasília, DF, 2024.

MOHAMUD MHT, AWEIS ADH, ADAM ASE, et al. Distribution and Frequency of ABO and Rhesus (D) Blood Groups in Somalia: A Retrospective Study on Students of Jazeera University, Mogadishu-Somalia. *Biomed Res Int.* 2022 Jan 30;2022:7981325. doi: 10.1155/2022/7981325.

NASCIMENTO DC, SANTOS GC, SOARES SSS., et al. Repercussions of sickle cell disease and sickle cell ulcers for men inserted in the world of work. *Rev Esc Enferm USP.* 2023;57:e20220384. <https://doi.org/10.1590/1980-220X-REEUSP-2022-0384en>.

NASCIMENTO MI, PRZIBILSKI ALF, COELHO CSG et al. Mortalidade atribuída à doença falciforme em crianças e adolescentes no Brasil, 2000–2019. *Rev Saude Publica.* 2022;56:65. <https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2022056003681>.

PANDEY A, KAUR H, BORAH S, et al. A systematic review on hydroxyurea therapy for sickle cell disease in India. *Indian J Med Res.* 2022 Aug;156(2):299-311. doi: 10.4103/ijmr.ijmr_3447_21.

PATHARE A, KINDI SA, DAAR S, et al. Cytokines in sickle cell disease. *Hematology.* 2003;8(5):329–37.

POLLO GAV, SUMARAUW SCP, HESSEL SS, TALLEI TE. Universal Primers for Amplification of TNF- α -308 Promoter Region. *Pak J Biol Sci.* 2019 Jan;22(12):585-589. doi: 10.3923/pjbs.2019.585.589.

POMPEO CM, FERREIRA JÚNIOR MA, CARDOSO AIQ, et al. Clinical-Epidemiological Characteristics and Mortality in Patients with Sickle Cell Anemia: A Retrospective Cohort Study of 1980 at 2018. *Int J Gen Med.* 2022 Feb 2;15:1057-1074. doi: 10.2147/IJGM.S342971.

REES DC, KILINC Y, UNAL S, et al. A randomized, placebo-controlled, double blind trial of canakinumab in children and young adults with sickle cell anemia. *Blood.* 2022;139(17):2642-2652.

SANTOS MP; MENEZES CPSR; COSTA DCCO, et al. Perfil epidemiológico de casos notificados da doença falciforme no Ceará. *Brazilian Journal of Development, Curitiba*, v.7, n.1, p. 6840-6852 jan. 2021. DOI:10.34117/bjdv7n1-462.

SILVA, RC R, BARBOSA, SP, SILVA, MEC Et al. Epidemiological and Clinical Profile of Users of the Municipal Reference Center for Individuals with Sickle Cell Disease in Feira de Santana/Bahia. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 7, p. e22510716510, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i7.16510. Disponível em:<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/16510>. Acesso em: 3 jul. 2024.

SOUSA AR, JESUS AC, ANDRADE RC, et al. Being a man with sickle cell disease: discourses about falling ill and self-care. *Acta Paul Enferm.* 2021;34:eAPE03384. DOI <http://dx.doi.org/10.37689/actaape/2021AO03384>.

SUNDD P, GLADWIN MT, NOVELLI EM. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annu Rev Pathol.* 2019 Jan 24;14:263-292. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838.

TOZATTO-MAIO K, GIROT R, LY ID, SILVA PINTO AC, et al. Polymorphisms in Inflammatory Genes Modulate Clinical Complications in Patients With Sickle Cell Disease. *Front Immunol*. 2020 Sep 4;11:2041. doi: 10.3389/fimmu.2020.02041.

TRAEGER-SYNODINOS J, HARTEVELD CL. Preconception carrier screening and prenatal diagnosis in thalassemia and hemoglobinopathies: challenges and future perspectives. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17:281- 291. doi:10.1080/14737159.2017.1285701.

TSUKAHARA K, CHANG X, MENTCH F, et al. Identification of genetic variants associated with clinical features of sickle cell disease. *Sci Rep*. 2024 Aug 29;14(1):20070. doi: 10.1038/s41598-024-70922-5.

VATS R, BRZOSKA T, BENNEWITZ MF, et al. Platelet Extracellular Vesicles Drive Inflammation-IL-1 β -Dependent Lung Injury in Sickle Cell Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Jan 1;201(1):33-46. doi: 10.1164/rccm.201807-1370OC.

VEIL R, BUSSY S, LOOTEN V, et al. Trajectories of Biological Values and Vital Parameters: An Observational Cohort Study of Adult Patients with Sickle Cell Disease Hospitalized for a Non-Complicated Vaso-Occlusive Crisis. *J Clin Med*. 2019 Sep 19;8(9):1502. doi: 10.3390/jcm8091502.

VHANDA D, CHINOWAITA F, NKOMO S., et al. Effects of repeated blood donation on iron status of blood donors in Zimbabwe: A cross-sectional study. *Health Sci Rep*. 2021 Nov 2;4(4):e426. doi: 10.1002/hsr2.426.

WANG X, JIANG F, LIANG Y, et al. Interleukin-1 β -31C/T and -511T/C polymorphisms were associated with preeclampsia in Chinese Han population. *PLoS One*. 2014 Sep 15;9(9):e106919. doi: 10.1371/journal.pone.0106919.

WARE RE, DAVIS BR, SCHULTZ WH, et al. Hydroxycarbamide versus chronic transfusion for maintenance of transcranial doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia-TCD With Transfusions Changing to Hydroxyurea (TWITCH): a multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet*. 2016 Feb 13;387(10019):661-670. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01041-7.

WEATHERALL DJ, PROVAN AB. Red cells I: inherited anaemias. *Lancet*. 2000 Apr 1;355(9210):1169-75. doi: 10.1016/s0140-6736(00)02073-0.

XEREZ ALBUQUERQUE, C. C. M., M. M. PINTO LUCIANO, C. L. ANDREOLA SILVA, Et al., "NOS3, ET1, TGF- β 1, and THBS1 Polymorphisms Modulating Clinical Complications in Sickle Cell Disease Patients". *Peer Review*, vol. 5, n $^{\circ}$ 26, dezembro de 2023, p. 465-8, doi:10.53660/1656.prw3235.

YAN J, LIU J, LIN CY; Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium (ANZGene); Csurhes PA, Pender MP, McCombe PA, Greer JM. Interleukin-6 gene promoter-572 C allele may play a role in rate of disease progression in multiple sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2012 Oct 22;13(10):13667-79. doi: 10.3390/ijms131013667.

YAWN BP, BUCHANAN GR, AFENYI-ANNAN AN. et al. Management of sickle cell

disease: summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. *JAMA*. 2014;312(10):1033–48.

ZHABYEYEV P, OUDIT GY. Sickle cell disease, interleukin-18, and arrhythmias. *Blood*. 2021 Mar 4;137(9):1138-1139. doi: 10.1182/blood.2020009690. PMID: 33661293.

ZHU G, YAO Y, PAN L, et al. Reduction of Leukocyte Counts by Hydroxyurea Improves Cardiac Function in Rats with Acute Myocardial Infarction. *Med Sci Monit*. 2015 Dec 17;21:3941-7. doi: 10.12659/msm.893744.

PERSPECTIVAS

Nossos resultados demonstram novas abordagens na AF, envolvendo associações entre polimorfismos genéticos em citocinas que exercem importância na modelação das principais clínicas observadas na doença.

Desta forma, acreditamos que nosso estudo seja essencial para obter maior conhecimento da AF, diferenciar biomarcadores de predisposição às crises vasculares, e também conhecer os possíveis polimorfismos em genes inflamatórios que possam modificar sua morbidade e mortalidade, gerando melhor qualidade de vida para os pacientes.

Entendemos ainda que, este estudo possui relevância por buscar demonstrar que polimorfismos concomitantemente com o tratamento com a HU interfiram na maior ou menor expressão de citocinas inflamatórias na AF, modificando sua clínica e influenciando um melhor acompanhamento e tratamento para pacientes.

6. CRONOGRAMA

ATIVIDADE	MESES – 2022											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Realização de Disciplinas			X	X	X		X	X	X	X	X	X
Treinamento de Metodologias de Biologia Molecular									X	X		
Envio do projeto ao Comitê de Ética											X	X
Escrita do projeto para Qualificação											X	X
ATIVIDADE	MESES – 2023											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Realização de Disciplinas	X					X	X	X	X	X	X	X
Escrita do projeto para Qualificação	X	X	X	X	X	X						
Qualificação							X					
Extração de DNA							X	X				
PCR									X	X		
Apresentação do trabalho em congressos nacionais e internacionais										X	X	
Sequenciamento									X	X	X	X
ATIVIDADE	MESES – 2024											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X					
Escrita do artigo	X	X	X	X	X	X						
Escrita da dissertação	X	X	X	X	X	X						
Defesa da dissertação						X	X		X			
Submissão de artigo para publicação										X		

7. EQUIPE DO PROJETO

Nome	Carga Horária semanal	Função	Atividades
Dr. José Pereira de Moura Neto	4h	Orientador, Coordenação, Escrita, Correção e Análises Práticas e Moleculares	Orientador
Dr. Sérgio Roberto Lopes Albuquerque	2h	Coorientador, Escrita e Correção	Orientador
Monik Oney Oliveira do Nascimento	20h	Mestranda - Coleta, Entrevista, Toda parte Molecular	Colaboradora
Mônica Moura de Souza	20h	Biomédica	Colaboradora
Dra. Cláudia Maria de Moura Abraham	2h	Gerente de sorologia	Colaboradora
Dr. José Marcelo Hipólito Carneiro	2h	Farmacêutico-bioquímico	Colaborador
Marcelo Reis Do Nascimento	2h	Farmacêutico-bioquímico	Colaborador
Maria José Dantas Coelho	2h	Farmacêutico-bioquímico	Colaborador
Adenor Lopes Oliveira	2h	Técnico Hemoterapia	Colaborador

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Imunologia celular e molecular*. 6. Ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.

ADAMS RJ, MCKIE VC, HSU L, et al., Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med*. 1998 Jul 2;339(1):5-11. doi: 10.1056/NEJM199807023390102.

ADORNO EV, COUTO FD, MOURA NETO JP. et al. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad Saude Publica*. 2005 Jan-Feb;21(1):292-8. doi: 10.1590/s0102-311x2005000100032.

ALAGBE AE, DOMINGOS IF, ADEKILE AD, et al., Anti-inflammatory cytokines in sickle cell disease. *Mol Biol Rep*. 2022 Mar;49(3):2433-2442. doi: 10.1007/s11033-021-07009-1.

ALAGBE AE, JUSTO JUNIOR AS, RUAS LP, et al., Interleukin-27 and interleukin-37 are elevated in sickle cell anemia patients and inhibit in vitro secretion of interleukin-8 in neutrophils and monocytes. *Cytokine*. 2018 Jul;107:85-92. doi: 10.1016/j.cyto.2017.12.001.

ALLALI S, MACIEL TT, HERMINE O, DE MONTALEMBERT M. Innate immune cells, major protagonists of sickle cell disease pathophysiology. *Haematologica*. 2020 Jan 31;105(2):273- 283. doi: 10.3324/haematol.2019.229989.

ALKINDI, S., AL-JADIDI, S., AL-ADAWI, S. et al. Multi-center study on mortality in children, and adults with sickle cell anemia-risk factors and causes of death. *Sci Rep* 14, 8584 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58328-9>.

ARCHER N, GALACTEROS F, BRUGNARA C. 2015 Clinical trials update in sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 2015 Oct;90(10):934-50. doi: 10.1002/ajh.24116

ASARE K, GEE BE, STILES JK, et al., Plasma interleukin-1beta concentration is associated with stroke in sickle cell disease. *Cytokine*. 2010 Jan;49(1):39-44. doi: 10.1016/j.cyto.2009.10.002.

ASHOURI R., FANGMAN M., BURRIS A., et al. Critical role of hemopexin mediated cytoprotection in the pathophysiology of sickle cell disease. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22:6408. doi: 10.3390/ijms22126408.

BALDWIN C, NOLAN VG, WYSZYNSKI DF, et al. Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. *Blood*. 2005 Jul 1;106(1):372-5. doi: 10.1182/blood-2005-02-0548.

BALLA J, VERCELLOTTI GM, JENEY V. et al., Heme, heme oxygenase, and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron- rich environment. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Dec;9(12):2119-37. doi: 10.1089/ars.2007.1787.

BALLAS SK. Update on pain management in sickle cell disease. *Hemoglobin*. 2011;35(5-

6):520-9. doi: 10.3109/03630269.2011.610478.

BARTEE E, MCFADDEN G. Cytokine synergy: an underappreciated contributor to innate anti-viral immunity. *Cytokine*. 2013 Sep;63(3):237-40. doi: 10.1016/j.cyto.2013.04.036. Epub 201

BATALIOTTI, AD; SOUZA, ND "Sequestro Esplênico Em Lactente Com Anemia Falciforme", p. 9 . In: Anais do 5º Congresso Internacional Sabará de Saúde Infantil. São Paulo: Blucher, 2020. ISSN 2357-7282, DOI 10.5151/sabara2020-09.

BELINI JUNIOR E, SILVA DG, TORRES LDE S. et al. Severity of Brazilian sickle cell disease patients: severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. *Blood Cells Mol Dis*. 2015 Apr;54(4):321-7. doi: 10.1016/j.bcmd.2015.01.011.

BOLANOS-MEADE J, FUCHS EJ, LUZNIK L, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation with posttransplant cyclophosphamide expands the donor pool for patients with sickle cell disease. *Blood*. 2012 Nov 22;120(22):4285-91. doi: 10.1182/blood-2012-07-438408.

BRAGA, J. A. Medidas gerais no tratamento das doenças falciformes. General measures in the treatment of sickle cell disease. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, v. 29, n. 3, p. 233–238, 2007.

BROWN HM, ANASTASI MR, FRANK LA, et al. Hemoglobin: a gas transport molecule that is hormonally regulated in the ovarian follicle in mice and humans. *Biol Reprod*. 2015 Jan;92(1):26. doi: 10.1095/biolreprod.114.124594.

BRAWLEY, O. W., CORNELIUS, L. J., EDWARDS, L. et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: hydroxyurea treatment for sickle cell disease. *Annals of internal medicine*, 2008. 148(12), 932–938. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-148-12-200806170-00220>.

CALVANI N, TUCCI M, RICHARDS HB, et al. Th1 cytokines in the pathogenesis of lupus nephritis: the role of IL-18. *Autoimmun Rev*. 2005 Nov;4(8):542-8. doi: 10.1016/j.autrev.2005.04.009.

CANÇADO RD & JESUS JA. A doença falciforme no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2007 Jul;29(3):204–6. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000300002>.

CARVALHO, G. C., ARAÚJO, J L, SANTOS, GT. et al.. Clinical and epidemiological profile of sickle cell anemia in children: an integrative review. *Rev Eletrônica Acervo Saúde*. Maranhão, V 12 (2): e 2774. 2020.

CASTRO, O et al., The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*, v. 84, n. 2, p. 643–9, 1994.

CHARACHE S, TERRIN ML, MOORE RD, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in

Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med.* 1995 May 18;332(20):1317-22. doi: 10.1056/NEJM199505183322001.

CHARACHE S, BARTON FB, MOORE RD, ET al. Hydroxyurea and sickle cell anemia. Clinical utility of a myelosuppressive "switching" agent. The Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *Medicine (Baltimore).* 1996 Nov;75(6):300-26. doi: 10.1097/00005792-199611000-00002.

CONRAN N, BELCHER JD. Inflammation in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2019;68(2-3):263-299. doi: 10.3233/CH-189012.

CONRAN N, FRANCO-PENTEADO CF, COSTA FF. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin.* 2009;33(1):1-16. doi: 10.1080/03630260802625709.

DEMBIC, Z. Chapter 7 - Cytokines of the Immune System: Chemokines. *The Cytokines of the Immune System*, p. 241–262, 2015. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/medicalproceedings/sabara2020/09.pdf>.> Acesso em: 19 fev 2023.

DINARELLO CA, KAPLANSKI G. Indeed, IL-18 is more than an inducer of IFN- γ . *J Leukoc Biol.* 2018 Aug;104(2):237-238. doi: 10.1002/JLB.CE0118-025RR.

DONG C. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. *Immunol Rev.* 2008 Dec;226:80-6. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00709.x.

DRVENICA IT, STANČIĆ AZ, MASLOVARIĆ IS, et al. Extracellular Hemoglobin: Modulation of Cellular Functions and Pathophysiological Effects. *Biomolecules.* 2022 Nov 17;12(11):1708. doi: 10.3390/biom12111708.

DUARTE JD, DESAI AA, SYSOL JR, 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.* 2016 Sep 16;11(9):e0163013. doi: 10.1371/journal.pone.0163013.

EATON WA. Hemoglobin S polymerization and sickle cell disease: A retrospective on the occasion of the 70th anniversary of Pauling's Science paper. *Am J Hematol.* 2020 Feb;95(2):205-211. doi: 10.1002/ajh.25687.

ELFORD HL. Effect of hydroxyurea on ribonucleotide reductase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1968 Oct 10;33(1):129-35. doi: 10.1016/0006-291x(68)90266-0.

EMBURY SH. Sickle cell disease. In: Hoffman R, Benz Junior EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE. *Hematology*. 2ª edição. New York: Churdhill Livingstone, p. 611-640, 1995.

FERRERO-MILIANI L, NIELSEN OH, ANDERSEN PS, GIRARDIN SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin Exp Immunol.* 2007 Feb;147(2):227-35. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03261.x.

FF. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and

- treatment. *Expert Rev Hematol*. 2010 Aug;3(4):443-58. doi: 10.1586/ehm.10.44.
- FIELD JJ, NATHAN DG. Advances in sickle cell therapies in the hydroxyurea era. *Mol Med*. 2014 Dec 16;20 Suppl 1(Suppl 1):S37-42. doi: 10.2119/molmed.2014.00187.
- FIorentino DF, BOND MW, MOSMANN TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989 Dec 1;170(6):2081-95. doi: 10.1084/jem.170.6.2081.
- FRENETTE PS. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol*. 2002 Mar;9(2):101-6. doi: 10.1097/00062752-200203000-00003.
- GABAY C, EMERY P, VAN VOLLENHOVEN R, et al. Tocilizumab monotherapy versus adalimumab monotherapy for treatment of rheumatoid arthritis (ADACTA): a randomised, double-blind, controlled phase 4 trial. *Lancet*. 2013 May 4;381(9877):1541-50. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60250-0.
- GARCIA NP, JÚNIOR ALS, SOARES GAS, et al. Sickle Cell Anemia Patients Display an Intricate Cellular and Serum Biomarker Network Highlighted by TCD4+CD69+ Lymphocytes, IL-17/MIP-1 β , IL-12/VEGF, and IL-10/IP-10 Axis. *J Immunol Res*. 2020 Jan 8;2020:4585704.
- GEARING AJ, BECKETT P, CHRISTODOULOU M, CHURCHILL M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL, et al., Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature*. 1994 Aug 18;370(6490):555-7. doi: 10.1038/370555a0.
- GHAfURI DL, ABDULLAHI SU, JIBIR BW, et al. World Health Organization's Growth Reference Overestimates the Prevalence of Severe Malnutrition in Children with Sickle Cell Anemia in Africa. *J Clin Med*. 2020 Jan 2;9(1):119. doi: 10.3390/jcm9010119.
- GILL FM, SLEEPER LA, WEINER SJ, et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*. 1995 Jul 15;86(2):776-83. PMID: 7606007.
- GLAROS AK, RAZVI R, SHAH N, et al. Voxelotor: alteration of sickle cell disease pathophysiology by a first-in-class polymerization inhibitor. *Therapeutic Advances in Hematology*, 12, 1–16. 2020. doi.org/10.1177/20406207211001136.
- GLUCKMAN E, CAPPELLI B, BERNAUDIN F, et al. Eurocord, the Pediatric Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, and the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. Sickle cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2017 Mar 16;129(11):1548-1556. doi: 10.1182/blood-2016-10-745711.
- GOZZELINO R, JENEY V, SOARES MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50:323-54. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105600.
- HEBBEL RP, OSAROGIAGBON R, KAUL D. The endothelial biology of sickle cell

- disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation*. 2004 Mar;11(2):129-51.
- HERRICK JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *JAMA*. 2014 Sep 10;312(10):1063. doi: 10.1001/jama.2014.11011.
- HOFMANN SR, RÖSEN-WOLFF A, TSOKOS GC, et al. Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. *Clin Immunol*. 2012 May;143(2):116-27. doi: 10.1016/j.clim.2012.02.005.
- HOLT PG, JONES CA. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy*. 2000 Aug;55(8):688-97. doi: 10.1034/j.1398-9995.2000.00118.x.
- HUNG J, MCQUILLAN BM, Chapman CM, et al. Elevated interleukin-18 levels are associated with the metabolic syndrome independent of obesity and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jun;25(6):1268-73. doi: 10.1161/01.ATV.0000163843.70369.12.
- KAISER P, ROTHWELL L, AVERY S, BALU S. Evolution of the interleukins. *Dev Comp Immunol*. 2004 May 3;28(5):375-94. doi: 10.1016/j.dci.2003.09.004.
- KAPOOR S, LITTLE JA, PECKER LH. Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease. *Mayo Clin Proc*. 2018 Dec;93(12):1810-1824. doi: 10.1016/j.mayocp.2018.08.001.
- KATO GJ, STEINBERG MH, GLADWIN MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest*. 2017 Mar 1;127(3):750-760. doi: 10.1172/JCI89741. Epub 2017 Mar.
- KATO GJ, PIEL FB, REID CD, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Mar 15;4:18010. doi: 10.1038/nrdp.2018.10.
- KEIKHAEI B, MOHSENI AR, NOROUZIRAD R, et al. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. *Eur Cytokine Netw*. 2013 Mar;24(1):45-52. doi: 10.1684/ecn.2013.0328.
- KOHNE E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2011 Aug;108(31-32):532-40. doi: 10.3238/arztebl.2011.0532.
- LANARO C, FRANCO-PENTEADO CF, CONRAN N, SAAD ST, Costa FF. Anti-inflammatory effect of hydroxyurea therapy in sickle cell disease. *Blood* 2006; 108: 3806.
- LANARO C, FRANCO-PENTEADO CF, Albuquerque DM, et al. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol*. 2009 Feb;85(2):235-42. doi: 10.1189/jlb.0708445.
- LOUREIRO MM, ROZENFELD S. Epidemiologia de internações por doença falciforme no Brasil [Epidemiology of sickle cell disease hospital admissions in Brazil]. *Rev Saude Publica*. 2005 Dec;39(6):943-9. Portuguese. doi: 10.1590/s0034-89102005000600012.
- MAINI RN. The role of cytokines in rheumatoid arthritis. The Croonian Lecture 1995. *J R Coll Physicians Lond*. 1996 Jul-Aug;30(4):344-51.

MARINO MW, DUNN A., GRAIL D., et al. Caracterização de camundongos deficientes em fator de necrose tumoral. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA.* 1997; 94:8093–8098. doi: 10.1073 / pnas. 94.15.8093.

MBURU J, ODAME I. Sickle cell disease: Reducing the global disease burden. *Int J Lab Hematol.* 2019 May;41 Suppl 1:82-88. doi: 10.1111/ijlh.13023.

MCCURDY PR, SHERMAN AS. Irreversibly sickled cells and red cell survival in sickle cell anemia: a study with both DF32P and 51CR. *Am J Med.* 1978 Feb;64(2):253-8. doi: 10.1016/0002-9343(78)90053-0.

MCGANN PT, WARE RE. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. *Expert Opin Drug Saf.* 2015;14(11):1749-58. doi: 10.1517/14740338.2015.1088827.

MILLER ST, WANG WC, IYER R, et al. BABY-HUG Investigators. Urine concentrating ability in infants with sickle cell disease: baseline data from the phase III trial of hydroxyurea (BABY HUG). *Pediatr Blood Cancer.* 2010 Feb;54(2):265-8. doi: 10.1002/pbc.22189.

Ministério da saúde. Doença falciforme terá agora notificação obrigatória. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2023/novembro/doenca-falciforme-tera-agora-notificacao-obrigatoria>. Acesso em: 20 jul 2024.

Ministério da saúde. Doenças Falciformes (DF) e outras Hemoglobinopatias. (2021). Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saes/sangue/programa-nacional-da-triagem-neonatal/doencas-falciformes-df-e-outras-hemoglobinopatias>. Acesso em: 18 fev 2023.

Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Doença Falciforme. [s.l: s.n.]. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota Informativa No 268/2020.

Ministério da Saúde. Relatório de Recomendação Medicamento Hidroxiureia para o tratamento de pacientes com doença falciforme (SS, Sbeta0 e SD Punjab), entre 9 e 24 meses de idade, sem sintomas e complicações. Brasília, DF, 2024.

MIRANDA JF; MATALOBOS ARL. Prevalência da anemia falciforme em crianças no Brasil / Prevalence of sickle cell anemia in children in Brazil. *Brazilian Journal of Health Review*, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 26903–26908, 2021. DOI: 10.34119/bjhrv4n6-261.

MORIKIS VA, HERNANDEZ AA, MAGNANI JL, et al. Targeting Neutrophil Adhesive Events to Address Vaso-Occlusive Crisis in Sickle Cell Patients. *Front Immunol.* 2021 Apr 28;12:663886. doi: 10.3389/fimmu.2021.663886.

MONTEIRO ACB, DORIGATTI DH, RODRIGUES AG, SILVIA BM. Anemia Falciforme, uma doença caracterizada pela alteração no formato das hemácias. *Revista Saúde em Foco*, no. 7, 2015.

MOTA FM, FERREIRA JÚNIOR MA, CARDOSO AIQ, et al., Analysis of the temporal trend of mortality from sickle cell anemia in Brazil. *Rev Bras Enferm.* 2022;75(4):e20210640.

<https://doi.org/10.1590/0034-7167-2021-0640>.

NAGEL RL, LABIE D. DNA haplotypes and the beta s globin gene. *Prog Clin Biol Res.* 1989;316B:371-93.

NAGEL RL, STEINBERG MH. Role of epistatic (modifier) genes in the modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. *Pediatr Pathol Mol Med.* 2001 Mar-Apr;20(2):123-36.

NAGEL RL, STEINBERG MH: Hemoglobin SC Disease and HbC Disorders. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL (ed.). *Disorders of Hemoglobin. Genetic, Pathophysiology, and Clinical Management.* Cambridge University Press, New York, 2001, pp 756-766.

NAKANISHI K, YOSHIMOTO T, TSUTSUI H, et al. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:423-74. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.423.

NARAZAKI M, TANAKA T, KISHIMOTO T. The role and therapeutic targeting of IL-6 in rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2017 Jun;13(6):535-551. doi: 10.1080/1744666X.2017.1295850.

NARDO-MARINO A, GLENTHØJ A, BREWIN JN et al. The significance of spleen size in children with sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 2022 Dec;97(12):1520-1528. doi: 10.1002/ajh.26703.

NASCIMENTO DC, SANTOS GC, SOARES SSS., et al. Repercussions of sickle cell disease and sickle cell ulcers for men inserted in the world of work. *Rev Esc Enferm USP.* 2023;57:e20220384. <https://doi.org/10.1590/1980-220X-REEUSP-2022-0384en>.

NIU X, NOURAIIE M, CAMPBELL A, et al. Angiogenic and inflammatory markers of cardiopulmonary changes in children and adolescents with sickle cell disease. *PLoS One.* 2009 Nov 23;4(11):e7956. doi: 10.1371/journal.pone.0007956.

NOGUCHI CT, RODGERS GP, SERJEANT G, et al. Levels of fetal hemoglobin necessary for treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med.* 1988 Jan 14;318(2):96-9. doi: 10.1056/NEJM198801143180207.

NOGUEIRA KDA, SILVA WDL, PAIVA SG. Diagnóstico laboratorial da anemia falciforme. *Revista Científica do ITPAC, Araguaína, v.6, n.4, Pub.2, out. 2013.*

OLIVEIRA VB, DEZAN MR, GOMES FCA, et al. CL -318C/T polymorphism of the CTLA-4 gene is an independent risk factor for RBC alloimmunization among sickle cell disease patients. *Int J Immunogenet.* 2017 Oct;44(5):219-224. doi: 10.1111/iji.12334.

ONIMOE G, ROTZ S. Sickle cell disease: A primary care update. *Cleve Clin J Med.* 2020 Jan;87(1):19-27. doi: 10.3949/ccjm.87a.18051. Epub 2020 Jan 2. PMID: 31990651.

PATHARE A, KINDI SA, DAAR S, DENNISON D. Cytokines in sickle cell disease. *Hematology.* 2003 Oct;8(5):329-37. doi: 10.1080/10245330310001604719.

PATHARE A, AL KINDI S, ALNAQDY AA, et al. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Am J Hematol*. 2004 Dec;77(4):323-8. doi: 10.1002/ajh.20196.

PAULING L, ITANO HA, et al., Sickle cell anemia a molecular disease. *Science*. 1949 Nov 25;110(2865):543-8. doi: 10.1126/science.110.2865.543.

PAULING L. MOLECULAR DISEASE AND EVOLUTION. *Bull N Y Acad Med*. 1964 May;40(5):334-42.

PECKER LH; LITTLE, J. Clinical Manifestations of Sickle Cell Disease Across the Lifespan. *Sickle Cell Disease and Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. p. 3–39, 2017.

PIEL FB, PATIL AP, HOWES RE, et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates *Lancet*. 2013 Jan 12;381(9861):142-51. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61229-X.

PLATT OS, ORKIN SH, DOVER G, et al. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. *J Clin Invest*. 1984 Aug;74(2):652-6. doi: 10.1172/JCI111464.

PLATT OS, BRAMBILLA DJ, ROSSE WF, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*. 1994;330(23):1639-443.

POMPEO CM, FERREIRA JÚNIOR MA, CARDOSO AIQ, et al. Clinical-Epidemiological Characteristics and Mortality in Patients with Sickle Cell Anemia: A Retrospective Cohort Study of 1980 at 2018. *Int J Gen Med*. 2022 Feb 2;15:1057-1074. doi: 10.2147/IJGM.S342971.

POPKO K, GORSKA E, DEMKOW U. (2010). Influence of interleukin-6 and G174C polymorphism in IL-6 gene on obesity and energy balance. *European journal of medical research*, 15 Suppl 2(Suppl 2), 123–127. <https://doi.org/10.1186/2047-783x-15-s2-123>.

PULE GD, MOWLA S, NOVITZKY N, et al. A systematic review of known mechanisms of hydroxyurea-induced fetal hemoglobin for treatment of sickle cell disease. *Expert Rev Hematol*. 2015 Oct;8(5):669-79. doi: 10.1586/17474086.2015.1078235.

REES DC, KILINC Y, UNAL S, et al. A randomized, placebo-controlled, double blind trial of canakinumab in children and young adults with sickle cell anemia. *Blood*. 2022;139(17):2642-2652.

ROCHA MF, MAIA ME, BEZERRA LR, et al. Clostridium difficile toxin A induces the release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal macrophages: role of interleukin-1beta, tumor necrosis factor alpha, and leukotrienes. *Infect Immun*. 1997 Jul;65(7):2740-6. doi: 10.1128/iai.65.7.2740-2746.1997.

RODRIGUES D; DE OW, et al., Diagnóstico Histórico da Triagem Neonatal para Doença Falciforme. *Rev. APS*, v. 13, n. 1, p. 34-45, Juiz de Fora, 2010. Disponível em <http://aps.ufjf.emnuvens.com.br/aps/article/viewFile/433/295>> Acesso em 18 mar. 2023.

RUIZ, MILTON A. Anemia falciforme: objetivos e resultados no tratamento de uma doença de saúde pública no Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.*, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 203-206, set. 2007.

SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.

SANTOS MP; MENEZES CPSR; COSTA DCCO, et al. Perfil epidemiológico de casos notificados da doença falciforme no Ceará. *Brazilian Journal of Development, Curitiba*, v.7, n.1, p. 6840-6852 jan. 2021. DOI:10.34117/bjdv7n1-462.

SARAF SL, MOLOKIE RE, NOURAIE M, et al. Differences in the clinical and genotypic presentation of sickle cell disease around the world. *Paediatr Respir Rev.* 2014 Mar;15(1):4-12. doi: 10.1016/j.prrv.2013.11.003.

SARRAY S, ALMAWI WY. Contribution of Reduced Interleukin-10 Levels to the Pathogenesis of Osteomyelitis in Children with Sickle Cell Disease. *Clin Vaccine Immunol.* 2015 Sep;22(9):1020-4. doi: 10.1128/CVI.00286-15.

SARRAY S, SALEH LR, LISA SALDANHA F, et al. Serum IL-6, IL-10, and TNF α levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. *Cytokine.* 2015 Mar;72(1):43-7. doi: 10.1016/j.cyto.2014.11.030.

SEGEL GB, HALTERMAN MW, LICHTMAN MA. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol.* 2011 Mar;89(3):359-72. doi: 10.1189/jlb.0910538.

SNELLER MC, FAUCI AS. Pathogenesis of vasculitis syndromes. *Med Clin North Am.* 1997 Jan;81(1):221-42. doi: 10.1016/s0025-7125(05)70512-5.

STEINBERG MH, RODGERS GP. Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers. *Semin Hematol.* 2001 Oct;38(4):299-306. doi: 10.1016/s0037-1963(01)90023-x. PMID: 11605164.

STEINBERG MH, BARTON F, CASTRO O, et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA.* 2003 Apr 2;289(13):1645-51. doi: 10.1001/jama.289.13.1645.

STEINBERG MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Scientific World Journal.* 2008 Dec 25;8:1295-324. doi: 10.1100/tsw.2008.157.

STREETLY A, SISODIA R, DICK M, et al. Evaluation of newborn sickle cell screening programme in England: 2010-2016. *Arch Dis Child.* 2018 Jul;103(7):648-653. doi: 10.1136/archdischild-2017-313213.

SUNDD P, GLADWIN MT, NOVELLI EM. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annu Rev Pathol.* 2019 Jan 24;14:263-292. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838.

TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease.

Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014 Sep 4;6(10):a016295. doi: 10.1101/cshperspect.a016295.

TAVAKKOLI F, NAHAVANDI M, WYCHE MQ, PERLIN E. Plasma levels of TNF-alpha in sickle cell patients receiving hydroxyurea. *Hematology*. 2004 Feb;9(1):61-4. doi: 10.1080/1024533032000158869.

THEIN SL, HOWARD J. How I treat the older adult with sickle cell disease. *Blood*. 2018 Oct 25;132(17):1750-1760. doi: 10.1182/blood-2018-03-818161.

TORRES, LS et al., Hemoglobin D-Punjab: Origin, distribution and laboratory diagnosis. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 37, n. 2, p. 120–126, 2014.

TOSTES MA, BRAGA JAP, LEN CA. Abordagem da crise dolorosa em crianças portadoras de doença falciforme. *Rev Cienc Med (Campinas)*. 2009 Jan-Fev;18(1):47-55.

TOZATTO-MAIO K, GIROT R, LY ID, SILVA PINTO AC, et al. Polymorphisms in Inflammatory Genes Modulate Clinical Complications in Patients With Sickle Cell Disease. *Front Immunol*. 2020 Sep 4;11:2041. doi: 10.3389/fimmu.2020.02041.

TRAEGER-SYNODINOS J, HARTEVELD CL. Preconception carrier screening and prenatal diagnosis in thalassemia and hemoglobinopathies: challenges and future perspectives. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17:281- 291. doi:10.1080/14737159.2017.1285701.

TSITSIKAS D.A., SIRIGIREDDY B., NZOUAKOU R., et al. Safety, tolerability, and outcomes of regular automated red cell exchange transfusion in the management of sickle cell disease. *J. Clin. Apher*. 2016;31:545– 550. doi: 10.1002/jca.21447.

TURNER MD, NEDJAI B, HURST T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Nov;1843(11):2563-2582. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014

VELLA F, LEHMANN H. Haemoglobin D Punjab (D Los Angeles). *J Med Genet*. 1974 Dec;11(4):341-8. doi: 10.1136/jmg.11.4.341.

VICHINSKY EP, NEUMAYR LD, Gold JI, et al. Neuropsychological Dysfunction and Neuroimaging Adult Sickle Cell Anemia Study Group. Neuropsychological dysfunction and neuroimaging abnormalities in neurologically intact adults with sickle cell anemia. *JAMA*. 2010 May 12;303(18):1823-31. doi: 10.1001/jama.2010.562.

VONA R, SPOSI NM, MATTIA L, et al. Sickle Cell Disease: Role of Oxidative Stress and Antioxidant Therapy. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Feb 16;10(2):296. doi: 10.3390/antiox10020296.

VORST, EPC; VAN DER. Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins (Vol. 94). 2020. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7>

WALTER MR. The molecular basis of IL-10 function: from receptor structure to the onset of signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;380:191-212. doi: 10.1007/978-3-662-43492-

5_9.

WARE RE, DAVIS BR, SCHULTZ WH, et al. Hydroxycarbamide versus chronic transfusion for maintenance of transcranial doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia-TCD With Transfusions Changing to Hydroxyurea (TWiTCH): a multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet*. 2016 Feb 13;387(10019):661-670. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01041-7.

WARE RE, DE MONTALEMBERT M, TSHILOLO L, ABBOUD MR. Sickle cell disease. *Lancet*. 2017 Jul 15;390(10091):311-323. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30193-9.

WEATHERALL DJ, PROVAN AB. Red cells I: inherited anaemias. *Lancet*. 2000 Apr 1;355(9210):1169-75. doi: 10.1016/s0140-6736(00)02073-0.

WENDELL, VB & CERQUEIRA, BAV & ZANETTE, ANGELA & REIS, et al. (2010). Cytokines and clinical events in the sickle cell anemia. *Gaz Méd Bahia*. 80. 53-55.

WILLIAMS TN, THEIN SL. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2018 Aug 31;19:113-147. doi: 10.1146/annurev-genom-083117-021320.

WILLIAMS TN, WEATHERALL DJ. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Sep 1;2(9):a011692. doi: 10.1101/cshperspect.a011692.

XIE WR, DENG H, LI H, BOWEN et al. Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia. *Neuroscience*. 2006 Oct 27;142(3):809-22. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.06.045.

ZANATTA T E MANFREDINI V. Comparação entre métodos laboratoriais de diagnóstico de Doenças Falciformes. *Revista Newslab*, 2009; 94: 180-194.

ZANETTE DL, SANTIAGO RP, LEITE IPR, et al.. Differential gene expression analysis of sickle cell anemia in steady and crisis state. *Ann Hum Genet*. 2019 Sep;83(5):310-317. doi: 10.1111/ahg.12290.

ZHANG JM, AN J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007 Spring;45(2):27-37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e.

ZHANG D, XU C, MANWANI D, FRENETTE PS. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood*. 2016 Feb 18;127(7):801-9. doi: 10.1182/blood-2015-09-618538.

ZIMMERMAN SA, SCHULTZ WH, DAVIS JS, et al. Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. *Blood*. 2004 Mar 15;103(6):2039-45. doi: 10.1182/blood-2003-07-2475.

9. ANEXOS

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO											
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP											
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA											
Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL SINTETASE, ENDOTELINA-1, TGF BETA E TROMBOSPONDINA-1 EM RISCOS VASCULARES NA DOENÇA FALCIFORME.											
Pesquisador: CINTHIA CRISTINA ATHEUS E XEREZ DE ALBUQUERQUE											
Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP:);											
Versão: 2											
CAAE: 87700518.7.0000.0009											
Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM											
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio											
DADOS DO PARECER											
Número do Parecer: 2.790.764											
Apresentação do Projeto:											
A Anemia Falciforme (AF) consiste na doença genética mais comum no Brasil. A alteração estrutural ocorre pela troca da adenina pela timina (GAGGTG) substituindo o ácido glutâmico por valina no sexto códon do gene da cadeia globina resultando na Hemoglobina S (HbS). (STEINBERG, 1995). Essa hemoglobina forma polímeros em situações de hipóxia, que deformam a membrana das hemácias dando a elas a forma de foice, podendo essa falcização ser definitiva dependendo da intensidade e duração da hipóxia. As manifestações clínicas são muito variáveis, e essa heterogeneidade clínica se deve a vários fatores inclusive genéticos. Pessoas com Anemia Falciforme apresentam estado inflamatório crônico, e essas reações acontecem principalmente na microvasculatura, gerando assim complicações clínicas e disfunções teciduais progressivas. Dessa forma, alterações genéticas que possam alterar a homeostase vascular podem estar associadas a complicações e à variabilidade clínica da AF.											
Objetivo: Nosso projeto tem o intuito de associar a presença dos polimorfismo do Óxido Nítrico Endotelial Sintetase, Endotelina-1, TGF Beta e											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq</td> <td style="padding: 2px;">CEP: 69.050-002</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Bairro: Chapada</td> <td style="padding: 2px;"></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">UF: AM</td> <td style="padding: 2px;">Município: MANAUS</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Telefone: (92)3655-0114</td> <td style="padding: 2px;">Fax: (92)3655-0112</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="padding: 2px;">E-mail: cep@hemoam.am.gov.br</td> </tr> </table>		Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq	CEP: 69.050-002	Bairro: Chapada		UF: AM	Município: MANAUS	Telefone: (92)3655-0114	Fax: (92)3655-0112	E-mail: cep@hemoam.am.gov.br	
Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq	CEP: 69.050-002										
Bairro: Chapada											
UF: AM	Município: MANAUS										
Telefone: (92)3655-0114	Fax: (92)3655-0112										
E-mail: cep@hemoam.am.gov.br											
Página 01 de 06											

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMACIONAL TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL SINTETASE, ENDOTELINA-1, TGF BETA E TROMBOSPONDINA-1 EM RISCOS VASCULARES NA DOENÇA FALCIFORME”**

Estamos realizando uma pesquisa para conhecermos melhor a prevalência das anemias conhecidas como hemoglobinopatias. O objetivo deste estudo é fornecer o diagnóstico desta anemia, bem com as suas características clínicas, melhorando o acompanhamento médico aos portadores e proporcionando uma melhor qualidade de vida aos mesmos.

É de grande importância que você entenda os princípios gerais que se seguem e que serão aplicados a todos os participantes do nosso estudo:

- A) Sua participação é totalmente voluntária;
- B) Você poderá interromper sua participação antes ou em qualquer momento do estudo. Sua recusa em participar não envolverá punições ou perda de seus direitos constituídos;
- C) Depois de lidas as explicações, você pode fazer qualquer pergunta necessária ao seu entendimento.

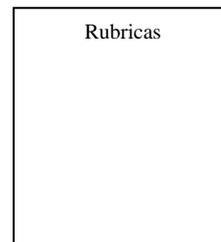
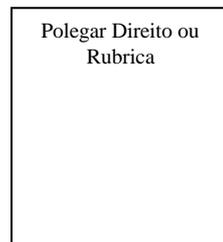
EXPLICAÇÃO BREVE SOBRE O PROJETO

Se você quiser participar, será colhida uma amostra de sangue da veia do braço (mais ou menos uma colher de chá) com seringa e agulha. Durante a coleta de sangue você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da picada após a coleta. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal bastante treinado.

As amostras de sangue serão utilizadas para a realização de um exame para diagnosticar anemia e você terá acesso total aos resultados, sendo estes enviados para o seu endereço pelos correios. O tempo previsto para a realização do nosso estudo será de aproximadamente dois (02) anos. Se o resultado for positivo, talvez seja necessária uma nova coleta de sangue para confirmar o resultado. Se o seu exame for confirmado como positivo você será orientado e convidado para o acompanhamento pelo sistema de saúde local.

BENEFÍCIOS

Até o momento não existe tratamento para a anemia genética. Um benefício de sua participação neste estudo é a contribuição para o conhecimento científico na área da saúde. Além disso, você poderá se beneficiar do diagnóstico, do aconselhamento e orientação sobre a anemia mesmo não sendo portador, ou seja, se for negativo para anemia. Devido a isso, o aconselhamento genético para você e as demais pessoas será de muita importância para um melhor acompanhamento e tratamento, uma vez que possibilitará a realização do acompanhamento clínico, laboratorial e aconselhamento genético adequado.



COMPROMISSO COM A CONFIDENCIALIDADE DA IDENTIDADE DO VOLUNTÁRIO

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos. Os registros da sua participação no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento dos participantes do projeto e do médico que o acompanha.

ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

O material coletado (amostra de sangue) será armazenado por até 10 anos somente se o Sr(a) autorizar. Sua amostra poderá ser utilizada em estudos posteriores desde que autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas ou, caso necessário, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e pelo responsável por esta pesquisa atual.

Por isso, pedimos que o Sr(a). se manifeste abaixo sobre o armazenamento e uso da sua amostra de sangue em estudos posteriores.

- Não, a minha amostra não deverá ser armazenada.
- Sim, concordo que a minha amostra seja armazenada e utilizada em estudos posteriores. Se concordar com o armazenamento da amostra de sangue, pedimos que se manifeste abaixo sobre a necessidade de ser consultado para cada nova pesquisa com a sua amostra e seus dados:
 - Não quero ser consultado, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.
 - Sim, exijo ser consultado para autorizar o uso de minha amostra no novo projeto de pesquisa.

Também em caso de concordar com o armazenamento da sua amostra de sangue, e não exigir ser consultado em estudos posteriores, é possível ainda que sua identidade seja desvinculada dos seus dados e da amostra de sangue, sendo substituídos por códigos, o que aumentaria a segurança de seu anonimato. Porém, a decisão de desvincular a sua identidade da amostra significa que em todos os estudos posteriores onde a sua amostra será utilizada não será possível relacionar os resultados à sua pessoa e assim o Sr.(a) não teria os possíveis benefícios

dos resultados do novo projeto de pesquisa. Assim, pedimos que se manifeste sobre a desvinculação de sua identidade da amostra de sangue e dados:

() Não, a minha identidade não pode ser desvinculada da amostra e dados

() Sim, concordo que minha identidade seja desvinculada da amostra e dados, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

O pesquisador responsável por este estudo, Prof. Dr. **JOSÉ PEREIRA DE MOURA NETO**, está à sua disposição e com ele você pode esclarecer qualquer dúvida que surja sobre o referido estudo, mantendo contato pessoal, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, MiniCampus UFAM, COROADO (92)3305-5000. Você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Av. Constantino Nery, 4397, Chapada, Fone: 3655-0100, CEP: 69050-002. Manaus-AM. Você receberá uma cópia deste TCLE, que será assinada pela pesquisadora e pelo Sr(a) em todas as páginas.

Polegar Direito ou Rubrica

Rubricas

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos.

Dr. José Pereira de Moura neto - Coordenador do projeto - Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular - Contato: (92) 3305-000 – (92) 8187-0920

Dra. Cinthia Xerez de Albuquerque – Médica Hematologista / Gerente Médica do departamento de Atendimento ao paciente da HEMOAM – Contato: (92) 3655-0209

Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte ao investigador antes de assinar.

Eu _____

aceito participar da pesquisa **“ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL SINTETASE, ENDOTELINA-1, TGF BETA E TROMBOSPONDINA-1 EM RISCOS**

VASCULARES NA ANEMIA FALCIFORME”. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Li este termo de assentimento e concordo em participar da pesquisa Assinei duas vias, uma que vai ficar comigo e outra que será guardada pelo pesquisador.

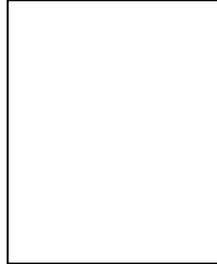
Local,

Data (dia/mês/ano)

Assinatura do participante do Estudo

Assinatura do pesquisador(a)

Impressão Datiloscópica:



Nome do Coordenador da pesquisa: **José Pereira de Moura Neto**

Assinatura do Coordenador da pesquisa

**CONSENTIMENTO PÓS-INFORMACIONAL TERMO DE CONSENTIMENTO
LIVRE E ESCLARECIDO
RESPONSÁVEL PELO MENOR DE IDADE**

Você está sendo convidado para autorizar a participação como responsável legal do menor de idade na pesquisa **“ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL SINTETASE, ENDOTELINA-1, TGF BETA E TROMBOSPONDINA-1 EM RISCOS VASCULARES NA ANEMIA FALCIFORME”**

Estamos realizando uma pesquisa para conhecermos melhor a prevalência das anemias conhecidas como hemoglobinopatias. O objetivo deste estudo é fornecer o diagnóstico desta anemia, bem com as suas características clínicas, melhorando o acompanhamento médico aos portadores e proporcionando uma melhor qualidade de vida aos mesmos.

É de grande importância que você entenda os princípios gerais que se seguem e que serão aplicados a todos os participantes do nosso estudo:

- A) A participação do menor é totalmente voluntária;
- B) Você poderá interromper a participação do menor antes ou em qualquer momento do estudo. Sua recusa da participação do menor não envolverá qualquer prejuízo para o atendimento do menor no serviço caso não aceite a participação do menor;
- C) Depois de lidas as explicações, você pode fazer qualquer pergunta necessária ao seu entendimento.

EXPLICAÇÃO BREVE SOBRE O PROJETO

Se você autorizar a participação do menor, será colhida uma amostra de sangue da veia do braço (mais ou menos uma colher de chá) com seringa e agulha. Durante a coleta de sangue o menor poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da picada após a coleta. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal bastante treinado.

Todas as amostras de sangue que forem utilizadas neste projeto, você terá acesso total aos resultados, sendo estes enviados para o seu endereço pelos correios ou entregues

pessoalmente pelo pesquisador deste projeto.

Também serão anexados ao projeto sem necessidade de nova entrevista, dados da sua clínica obtidos do seu prontuário médico, bem como dados hematológicos e bioquímicos de possíveis recoletas de sangue que realizará caso seja acompanhado por médico do hospital ou de posto de saúde. Reitero que os dados hematológicos e bioquímicos posteriores para cada momento de seu retorno, não será necessário recoletar seu sangue, uma vez que pegaremos os dados que constarão no prontuário médico.

BENEFÍCIOS

Até o momento não existe tratamento para a anemia genética. Um benefício de sua participação neste estudo é a contribuição para o conhecimento científico na área da saúde. Além disso, você poderá se beneficiar do diagnóstico, do aconselhamento e orientação sobre a anemia mesmo não sendo portador, ou seja, se for negativo para anemia. Devido a isso, o aconselhamento genético para você e as demais pessoas será de muita importância para um melhor acompanhamento e tratamento, uma vez que possibilitará a realização do acompanhamento clínico, laboratorial e aconselhamento genético adequado.

Polegar Direito ou
Rubrica

Rubricas

COMPROMISSO COM A CONFIDENCIALIDADE DA IDENTIDADE DO VOLUNTÁRIO

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos. Os registros da sua participação no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento dos participantes do projeto e do médico que o acompanha.

ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

O material coletado (amostra de sangue) será armazenado por até 10 anos somente se você e seu responsável legal autorizar. Sua amostra poderá ser utilizado em estudos posteriores desde que autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas ou, caso necessário, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e pelo responsável por esta pesquisa atual.

Por isso, pedimos que o Sr(a). se manifeste abaixo sobre o armazenamento e uso da amostra de sangue menor em estudos posteriores.

Não, a amostra não deverá ser armazenada.

Sim, concordo que a amostra seja armazenada e utilizada em estudos posteriores. Se concordar com o armazenamento da amostra de sangue, pedimos que se manifeste abaixo sobre a necessidade de ser consultado para cada nova pesquisa com a sua amostra e seus dados:

Não quero ser consultado, mesmo sabendo que o menor não terá os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Sim, exijo ser consultado para autorizar o uso da amostra no novo projeto de pesquisa.

Também em caso de concordar com o armazenamento da amostra de sangue, e não exigir ser consultado em estudos posteriores, é possível ainda que sua identidade e a do menor seja desvinculada dos seus dados e da amostra de sangue, sendo substituídos por códigos, o que aumentaria a segurança de seu anonimato. Porém, a decisão de desvincular a identidade da amostra significa que em todos os estudos posteriores onde a amostra será utilizada não será possível relacionar os resultados à sua pessoa e assim o Sr.(a) como representante legal do menor não teria os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Assim, pedimos que se manifeste sobre a desvinculação da identidade da amostra do menor e dados: () Não, a identidade do menor não pode ser desvinculada da amostra e dados

() Sim, concordo que identidade do menor seja desvinculada da amostra e dados, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

O pesquisador responsável por este estudo, Prof. Dr. **JOSÉ PEREIRA DE MOURA NETO**, está à sua disposição e com ele você pode esclarecer qualquer dúvida que surja sobre o referido estudo, mantendo contato pessoal, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, MiniCampus UFAM, COROADO (92)3305-5000. Você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Av. Constantino Nery, 4397, Chapada, Fone: 3655-0100, CEP: 69050-002. Manaus-AM. Você receberá uma cópia deste TCLE, que será assinada pela pesquisadora e pelo Sr(a) em todas as páginas.

Polegar Direito ou
Rubrica

Rubricas

Se você ou seus pais tiverem alguma dúvida é só nos procurar pelos seguintes telefones:

Dr. José Pereira de Moura neto - Coordenador do projeto - Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular - Contato: (92) 3305-000 – (92) 8187-0920

Dra. Cinthia Xerez de Albuquerque – Médica Hematologista e Pediatra da HEMOAM – Contato: (92) 3655-0209

Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte ao investigador antes de assinar.

Eu, como representante legal do menor _____

aceito a participação na pesquisa **“ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL SINTETASE, ENDOTELINA-1, TGF BETA E TROMBOSPONDINA-1 EM**

RISCOS VASCULARES NA ANEMIA FALCIFORME”.Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Li este termo de assentimento e concordo em participar da pesquisa Assinei duas vias, uma que vai ficar comigo e outra que será guardada pelo pesquisador.

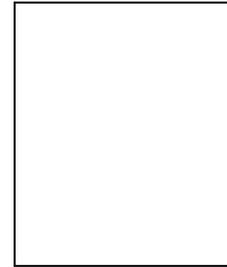
Local,

Data (dia/mês/ano)

Assinatura do participante do Estudo

Assinatura do pesquisador(a)

Impressão Datiloscópica:



Nome do Coordenador da pesquisa: **José Pereira de Moura Neto**

Assinatura do Coordenador da pesquisa:

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMACIONAL TERMO DE ASSENTIMENTO MENOR DE IDADE

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL SINTETASE, ENDOTELINA-1, TGF BETA ETROMBOSPONDINA-1 EM RISCOS VASCULARES NA DOENÇA FALCIFORME”**

Primeiramente gostaria de esclarecer que seus pais foram consultados e receberam explicação do projeto e autorizaram explicar o estudo também a você.

EXPLICAÇÃO BREVE SOBRE O PROJETO

As crianças que irão participar dessa pesquisa têm entre 2 a 17 anos de idade. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir. Se você quiser participar, será colhida uma amostra de sangue da veia do braço (mais ou menos uma colher de chá) com seringa e agulha.

O objetivo deste estudo é fornecer o diagnóstico de anemia, bem como as suas características clínicas e sociais, melhorando o acompanhamento médico aos que a possuem, e proporcionando uma melhor qualidade de vida aos mesmos.

Durante a coleta de sangue você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da picada após a coleta. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal bastante treinado.

As amostras de sangue serão utilizadas para a realização de um exame para diagnosticar anemia e você terá acesso total aos resultados, sendo estes enviados para o seu endereço pelos correios. Caso o resultado for positivo, talvez seja, necessário uma nova coleta de sangue para confirmar o resultado.

O sangue será coletado através da utilização de materiais novos, estéreis e descartáveis, por pessoal habilitado e especializado. As amostras para análise molecular serão retiradas das mesmas amostras coletadas para o diagnóstico, sem a necessidade de coletas extras. O resultado do exame será informado aos seus pais tão logo esteja disponível. Também serão anexados ao projeto sem necessidade de nova entrevista, dados da sua clínica obtidos do seu

prontuário médico, também conhecida como ficha médica. Além destes dados, também pegaremos os dados de exame de sangue, conhecido como dados hematológicos e bioquímicos de possíveis novas coletas que realizará caso seja acompanhado por médico do hospital ou de posto de saúde. Confirmando que os dados hematológicos e bioquímicos posteriores para cada momento de seu retorno, não será necessário coletar novamente seu sangue, uma vez que pegaremos os dados que constarão no prontuário médico

Todavia, há coisas boas que podem acontecer se você participar da pesquisa. Caso permita a coleta e sua participação, um grande benefício é a contribuição para o conhecimento científico sobre anemias na área da saúde. Você poderá se beneficiar do diagnóstico, do aconselhamento e orientação sobre a doença anemia, mesmo não sendo positivo para anemia.

Polegar Direito
ou
Rubricas

Rubricas

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der.

BENEFÍCIOS

Até o momento não existe tratamento para a anemia genética. Um benefício de sua participação neste estudo é a contribuição para o conhecimento científico na área da saúde. Além disso, você poderá se beneficiar do diagnóstico, do aconselhamento e orientação sobre a anemia mesmo não sendo portador, ou seja, se for negativo para anemia. Devido a isso, o aconselhamento genético para você e as demais pessoas será de muita importância para um melhor acompanhamento e tratamento, uma vez que possibilitará a realização do acompanhamento clínico, laboratorial e aconselhamento genético adequado.

COMPROMISSO COM A CONFIDENCIALIDADE DA IDENTIDADE DO VOLUNTÁRIO

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos. Os registros da sua participação no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento dos participantes do projeto e do médico que o acompanha.

ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

O material coletado (amostra de sangue) será armazenado por até 10 anos somente se você autorizar. Sua amostra poderá ser utilizada em estudos posteriores desde que autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e hemoterapia do Amazonas ou, caso necessário, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e pelo responsável por esta pesquisa atual.

Por isso, pedimos que você se manifeste abaixo sobre o armazenamento e uso da sua amostra de sangue em estudos posteriores.

() Não, a minha amostra não deverá ser armazenada.

() Sim, concordo que a minha amostra seja armazenada e utilizada em estudos posteriores. Se concordar com o armazenamento da amostra de sangue, pedimos que se manifeste abaixo

sobre a necessidade de ser consultado para cada nova pesquisa com a sua amostra e seus dados:

- () Não quero ser consultado, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.
- () Sim, exijo ser consultado para autorizar o uso de minha amostra no novo projeto de pesquisa.

Também em caso de concordar com o armazenamento da sua amostra de sangue, e não exigir ser consultado em estudos posteriores, é possível ainda que sua identidade seja desvinculada dos seus dados e da amostra de sangue, sendo substituídos por códigos, o que aumentaria a segurança de seu anonimato. Porém, a decisão de desvincular a sua identidade da amostra significa que em todos os estudos posteriores onde a sua amostra será utilizada não será possível relacionar os resultados à sua pessoa e assim você não teria os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Polegar Direito ou Rubricas

Rubricas

Assim, pedimos que se manifeste sobre a desvinculação de sua identidade da amostra de sangue e dados:

- () Não, a minha identidade não pode ser desvinculada da amostra e dados
- () Sim, concordo que minha identidade seja desvinculada da amostra e dados, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

O pesquisador responsável por este estudo, Prof. Dr. **JOSÉ PEREIRA DE MOURA NETO**, está à sua disposição e com ele você pode esclarecer qualquer dúvida que surja sobre o referido estudo, mantendo contato pessoal, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, MiniCampus UFAM, COROADO (92)3305-5000.

Você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Av. Constantino Nery, 4397, Chapada, Fone: 3655-0100, CEP: 69050-002. Manaus-AM. Você receberá uma cópia deste TCLE, que será assinada pela pesquisadora e pelo Sr(a) em todas as páginas.

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos.

Dr. José Pereira de Mouro Neto - Coordenador do projeto - Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular – Rua Alexandre Amorim N: 330 - Bairro Aparecida - Manaus/AM - Contato:(92) 3305-000 – (92) 98187-0920.

Dra. Cinthia Xerez de Albuquerque – Médica Hematologista e Pediatra da HEMOAM – Contato: (92) 3655-0209 –(92) 98249-1113.

Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte ao investigador antes de assinar.

Eu, _____ aceito a participação
na pesquisa

“ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL SINTETASE, ENDOTELINA-1, TGF BETA E TROMBOSPONDINA-1 EM RISCOS

VASCULARES NA DOENÇA FALCIFORME”. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e autorizar a participação do menor, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desvincular minha participação que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

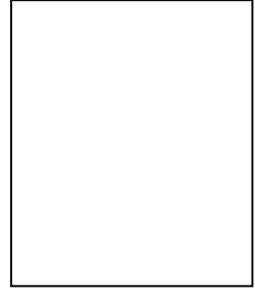
Li este termo de assentimento e concordo em participar da pesquisa assinei duas vias, uma que vai ficar comigo e outra que será guardada pelo pesquisador.

Local, Data (dia/mês/ano)

Assinatura do participante do Estudo

Assinatura do pesquisador(a)

Impressão Datiloscópica:



Nome do Coordenador da pesquisa: **José Pereira de Moura Neto**

Assinatura do Coordenador da pesquisa

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Potenciais Biomarcadores Celulares e Solúveis Associados a Diferentes Haplótipos e Fenótipos de Anemia Falciforme.

Pesquisador: Nadja Pinto Garcia

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56413316.9.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.864.640

Apresentação do Projeto:

As doenças falciformes (DFs) são as desordens monogênicas mais prevalentes, responsáveis por alta mortalidade e morbidade com uma sobrevivência média estimada de 45 a 48 anos na sociedade ocidental, consistindo em um problema de saúde pública em várias nações (Van Beers et al., 2015).

Trata-se de um estudo observacional analítico transversal. Amostragem: Pacientes diagnosticados com anemia falciforme, tanto em crises vaso-oclusivas quanto em estado estacionário, atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-HEMOAM por

livre demanda, localizada na cidade de Manaus-AM. Os indivíduos enquadrados no grupo controle serão doadores de sangue, coletados ao acaso, sem doenças aparentes. Coleta de Dados e Material Biológico: A coleta de dados e amostra biológica será realizada na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHEMOAM, onde os indivíduos serão abordados e convidados a participar da pesquisa e assinar em

seguida o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE e posteriormente será aplicado um questionário estruturado, com itens como:

Número de identificação, nome do candidato amostrado, sexo, idade, local de nascimento e origem; dados sobre a sintomatologia da doença, tipos de infecções, uso de medicamentos,

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Marcadores de ativação da inflamação na Doença Falciforme.

Pesquisador: Evilázio Cunha Cardoso

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 71147817.3.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.478.469

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa propõe determinar os níveis circulantes de DAMPs nas crises de agudização da Doença Falciforme, assim como sua correlação com a ativação de diferentes compartimentos da resposta imune inata.

A doença falciforme é uma hemoglobinopatia caracterizada por hemólise crônica e tendência a fenômenos vasoclusivos. Clinicamente ela se manifesta como uma doença inflamatória crônica com lesão orgânica progressiva, e episódios recorrentes de agudização. Dados recentes mostram que mediadores inflamatórios liberados pela hemólise e pela lesão tecidual, conhecidos como DAMPs (padrões moleculares associados ao perigo imunológico) exercem papel importante na ativação e perpetuação da resposta inflamatória. Entre os principais DAMPs destacam-se o heme e o HMGB1.

Uma das características mais importantes da doença falciforme é a propensão a fenômenos tromboembólicos. Neste projeto pretendemos avaliar os níveis de heme e HMGB1 durante as crises de agudização da doença falciforme, e correlaciona-los com marcadores de ativação inflamatória e da coagulação. A identificação do papel destes DAMPs na doença falciforme tem o potencial de abrir novos caminhos para o tratamento desta condição.

A hipótese dos pesquisadores é que os níveis dos DAMPs heme e HMGB1 estejam correlacionados com a ativação da coagulação e com o recrutamento de leucócitos na fase aguda da doença.

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br