



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

MARCONDES JOSÉ DE VASCONCELOS COSTA SOBREIRA

**CARACTERIZAÇÃO GÊNICA E PROTEICA DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME DURANTE E APÓS CRISE VASO-
OCCLUSIVA**

RECIFE

2020

MARCONDES JOSÉ DE VASCONCELOS COSTA SOBREIRA

**CARACTERIZAÇÃO GÊNICA E PROTEICA DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME DURANTE E APÓS CRISE VASO-
OCLUSIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo

RECIFE

2020

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Sobreira, Marcondes José de Vasconcelos Costa

Caracterização gênica e proteica de citocinas inflamatórias em pacientes com anemia falciforme durante e após crise vaso-oclusiva / Marcondes José de Vasconcelos Costa Sobreira. - 2020.

70 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra.

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2020.

Inclui referências e anexos.

1. Anemia falciforme. 2. Citocinas. 3. Fisiopatologia. I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (orientador). II. Araújo, Antonio Roberto Lucena de (coorientador) III. Título.

616.527

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-300

MARCONDES JOSÉ DE VASCONCELOS COSTA SOBREIRA

**CARACTERIZAÇÃO GÊNICA E PROTEICA DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM
PACIENTE COM ANEMIA FALCIFORME DURANTE E APÓS CRISE VASO-
OCLUSIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração Genética, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovado em 27/02/2020

Banca Examinadora:

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Jaqueline de Azevedo Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Igor de Farias Domingos
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Dra. Michelly Cristiny Pereira

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, minha grande inspiração e fonte infinita de conhecimento, que me guia e me garante nas minhas escolhas e decisões.

À minha família, que me acompanha desde sempre e me apoia diante das dificuldades que apareceram no meu caminho, sempre me mostrando o lado positivo e o amor que têm por mim.

A todos que fazem parte do LABCEN, em destaque o professor Antônio Roberto, Peu, Gabi Arcanjo, Aínda, Thais e Rodrigo; e uma imensa gratidão ao professor Marcos André por ter me aceitado no seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos e suporte fornecido, ao incentivo acadêmico e à amizade dos membros do laboratório.

Aos meus amigos que sempre me estenderam a mão quando precisei e nunca me deixaram desistir dos meus sonhos, em especial a Manuela e Sérgio, meus sinceros agradecimentos.

A Victória, que esteve me acompanhando desde o início do mestrado, me apoiando independente dos momentos ruins ou bons pelos quais passamos juntos.

Por fim, agradeço a todos que, mesmo não tendo sido citados, tiveram participação direta ou indiretamente nessa minha conquista.

“A instrução científica é a artéria
através da qual as soluções dos
problemas de amanhã fluem.”

— NEIL DEGRASSE TYSON

RESUMO

As crises vaso-oclusivas (CVO) são a principal causa de morbidade nos portadores de anemia falciforme. A produção desbalanceada de citocinas contribui com o progresso da vaso-oclusão, sendo sua caracterização importante para melhor compreensão da fisiopatologia da doença. Desse modo, este trabalho visa descrever o perfil de expressão gênica e proteica das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α pelos granulócitos polimorfonucleares (PMN) e células mononucleares (CM) nos pacientes durante e após crise vaso-oclusiva. Foram analisados 46 pacientes com anemia falciforme, divididos em controles estáveis e caso, subdivididos em pacientes em crise e pós crise. Foi realizada separação de CM e PMN pela técnica de Ficoll-Hypaque para posterior extração do mRNA, seguida da síntese do cDNA para realização de qPCR pelo sistema TaqMan $^{\text{®}}$. As dosagens séricas foram realizadas pela técnica de ELISA. Os resultados mostraram que apenas os PMN, em ambos os pacientes em crise e pós-crise, apresentaram maior expressão das quatro citocinas quando comparados ao grupo controle ($0,0001 \leq p \leq 0,0381$). Além disso, quando os mesmos pacientes em crise e pós crise foram comparados entre si, somente a IL-6 apresentou-se mais elevada após a crise ($p=0,0175$) para os PMN, demonstrando que estes são os principais moduladores das CVOs, com alta expressão de IL-6. Somente a IL-8 apresentou dosagem compatível com os limites do kit, estando consideravelmente elevada na crise em comparação com os pacientes controle ($P=0,0009$).

Palavras-chave: Anemia falciforme; vaso-oclusão; citocinas.

ABSTRACT

Vaso-occlusive crises (CVO) are the main cause of morbidity in patients with sickle cell anemia. The unbalanced production of cytokines contributes to the progress of vaso-occlusion, and its characterization is important for a better understanding of the pathophysiology of the disease. Thus, this work aims to describe the gene and protein expression profile of the cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α by polymorphonuclear granulocytes (PMN) and mononuclear cells (CM) in patients during and after vaso-occlusive crisis. 46 patients with sickle cell anemia were analyzed, divided into stable and case controls, subdivided into crisis and post crisis patients. Separation of CM and PMN was performed using the Ficoll-Hypaque technique for subsequent extraction of the mRNA, followed by the synthesis of the cDNA to perform qPCR by the TaqMan® system. Serum measurements were performed using the ELISA technique. The results showed that only PMN, in both crisis and post-crisis patients, showed greater expression of the four cytokines when compared to the control group ($0.0001 \leq p \leq 0.0381$). In addition, when the same patients in crisis and post crisis were compared to each other, only IL-6 was higher after the crisis ($p = 0.0175$) for PMN, demonstrating that these are the main modulators of CVOs, with high expression of IL-6. Only IL-8 showed dosage compatible with the kit limits, being considerably elevated in the crisis compared to control patients ($P = 0.0009$).

Keywords: Sickle cell anemia; vaso-occlusion; cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Número de crianças nascidas com Anemia Falciforme no mundo.....	17
Figura 2: Fisiopatologia da anemia falciforme.....	19
Figura 3: Modelo da fisiopatologia da vaso-oclusão.....	22
Figura 4: Via de sinalização da IL-1 β	25
Figura 5: Via de sinalização da IL-6.....	27
Figura 6: Via de sinalização da IL-8.....	29
Figura 7: Via de sinalização do TNF- α	31
Figura 8: Expressão das citocinas pelas células mononucleares entre grupos não pareados.....	40
Figura 9: Expressão das citocinas pelas células mononucleares entre grupos pareados.....	41
Figura 10: Expressão das citocinas pelos granulócitos entre grupos não pareados.....	42
Figura 11: Expressão das citocinas pelos granulócitos entre grupos pareados..	43
Figura 12: Dosagem sérica das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Citocinas, suas principais fontes e funções.....	32
Tabela 2: Caracterização laboratorial dos pacientes incluídos no estudo.....	38
Tabela 3: Caracterização demográfica dos pacientes incluídos no estudo.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
A	Adenina
AF	Anemia Falciforme
ADAM17	Proteína contendo domínio 17 de desintegrina e metaloproteinase
AKT	Quinase Serina/Treonina
CAM	Molécula de adesão celular
CCS	Centro de Ciências da Saúde
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CM	Célula Mononuclear
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CVO	Crises Vaso-oclusivas
CXC	Quimiocina
CXCR	Receptor de Quimiocina
DAMP	Padrão molecular associado a dano
DF	Doença Falciforme
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
ESL	Ligante da E-selectina
G	Guanina
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
gp130	Glicoproteína 130
Glu	Ácido Glutâmico
Hb	Hemoglobina
Hb A	Hemoglobina A
Hb A2	Hemoglobina A2
HBB	Gene da Hemoglobina Subunidade Beta
Hb F	Hemoglobina fetal
Hb S	Hemoglobina S
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média

HEMOPE	Hospital de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
ICAM	Molécula de Adesão Intracelular
IL	Interleucina
ICE	Enzima conversora de IL-1
IRAK	Quinase associada ao receptor de IL-1
IP3	Inositolfosfato-3
Jak	Janus quinase
Mac-1	Antígeno Macrófago-1
MADCAM-1	Molécula 1 de adesão celular da mucosa
MAPK	Proteínas quinase ativadas por mitógeno
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MLKL	Domínio de linhagem cinase mista
mRNA	RNA mensageiro
MyD88	A resposta primária da diferenciação mielóide 88
NO	Óxido nítrico
NF-Kb	Fator nuclear kappa-beta
PAMP	Padrão molecular associado a patógeno
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PI3K	Fosfoinositol 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
PIPK	Fosfatidilinositol fosfato-quinase
PLCβ2	Fosfatidilinositol bifosfato fosfodiesterase β2
PMN	Polimorfonuclear
PRR	Receptor reconhecedor de patógeno
PSGL	Ligante glicoproteico da P-selectina
RhoA	Membro A da família dos homólogos Ras
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real
sIL-6R	Receptor solúvel da IL-6
STAT-3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição-3
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR	Receptor do tipo <i>Toll-like</i>

TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRADD	Domínio de morte associado ao receptor de TNF
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
Val	Valina
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	ANEMIA FALCIFORME	17
2.1.1	Epidemiologia	17
2.1.2	Fisiopatologia	18
2.2	CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS.....	22
2.2.1	IL-1β	24
2.2.2	IL-6	25
2.2.3	IL-8	27
2.2.4	TNF-α	29
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	CASUÍSTICA	34
4.2	DESENHO DO ESTUDO	34
4.3	ASPECTOS ÉTICOS	35
4.4	ANÁLISE CLÍNICA E HEMATOLÓGICA	36
4.5	ANÁLISE MOLECULAR	36
4.5.1	Isolamento de Células Mononucleares e Granulócitos do sangue periférico	36
4.5.2	Extração do RNA a partir das amostras de CM e PMN	36
4.5.3	Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real	37
4.5.4	Avaliação da dosagem sérica por ELISA	37
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5	RESULTADOS	38
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES.....	38

5.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS PELAS CÉLULAS MONONUCLEARES	39
5.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS PELAS CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES	41
5.4	ANÁLISE DA DOSAGEM SÉRICA DAS CITOCINAS IL-1B, IL-6, IL-8 E TNF- α	43
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÕES	50
8	REFERÊNCIAS	51
9	ANEXOS	59
9.1	ANEXO I – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética	59
9.2	ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	60
10	CURRÍCULO LATTES ATUALIZADO	67

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma anemia hemolítica caracterizada por quadro inflamatório crônico, de ocorrência mundial e com prevalência em populações afrodescendentes, decorrente de uma mutação em homozigose no gene da globina β , resultando na formação de uma hemoglobina mutante, a hemoglobina S (Hb S), ao invés da hemoglobina normal (Hb A). Em condições especiais, como hipóxia, diminuição do pH, baixas concentrações de hemoglobina fetal (Hb F) e hemoglobina A2 (Hb A2), a hemoglobina variante se polimeriza e precipita, causando alterações morfológicas na hemácia. Tais alterações culminam nos eventos hemolíticos e vaso-oclusivos, característicos dos pacientes com AF, sendo este último a principal causa de morbidade nesses indivíduos.

Uma vez alterada, a membrana das hemácias falciformes apresenta uma maior interação com o endotélio vascular, ativando-o e estimulando a produção de moléculas de adesão endotelial, como a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), favorecendo a agregação de plaquetas e leucócitos ao endotélio. A obstrução do fluxo sanguíneo e ativação celular, portanto, provocam uma resposta inflamatória, que por sua vez desencadeia diversos mecanismos que colaboram com a patogênese da vaso-oclusão, incluindo: ativação endotelial, indução da adesão de hemácias e leucócitos ao endotélio vascular, ativação plaquetária e desregulação da apoptose endotelial.

Apesar das crises de dor serem a principal causa de internação dos pacientes nos serviços de pronto atendimento dos hospitais, a gravidade e ocorrência desses episódios variam bastante entre os pacientes, desde horas a dias de crises. Inúmeros processos podem estar responsáveis por essa diversidade, mas há evidências que sugerem as oscilações de citocinas inflamatórias como importantes moduladores dessa heterogeneidade clínica, pois desempenham um papel fundamental na instalação e na manutenção das crises vaso-oclusivas (CVO), sobretudo as crises de dor, tornando-as potenciais alvos de estudo, uma vez que as intervenções farmacológicas se apoiam na fisiopatologia dessa manifestação.

Diante do ambiente inflamatório em que o endotélio se encontra durante as crises vaso-oclusivas, as citocinas são produzidas por diversas células, em especial os leucócitos, podendo ser divididos em células mononucleares (CM) e granulócitos polimorfonucleares (PMN). O primeiro grupo é representado pelos linfócitos e monócitos, enquanto o segundo corresponde majoritariamente aos neutrófilos, por serem produzidos em larga escala durante o processo inflamatório como primeira linha de defesa do organismo. Tais células produzem as citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, TNF α e IL1 β , que demonstram uma função desencadeadora das respostas inflamatórias e, por isso, são os alvos de estudo deste trabalho. Ainda que bem estudadas durante as crises, pouco se sabe sobre a manutenção do microambiente endotelial após a resolução dessa manifestação, o que faz com que também seja necessário o estudo da expressão dessas citocinas posterior à crise.

Dessa forma, as citocinas supracitadas podem estar diferencialmente expressas nos dois momentos (durante e após a crise), e essa oscilação estar relacionada com a completa resolução ou não dessa manifestação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANEMIA FALCIFORME

2.1.1 Epidemiologia

A doença falciforme (DF) representa um grupo de doenças que apresentam o gene da hemoglobina S em homo ou heterozigose e está presente em grande parte da população, onde aproximadamente 20 a 25 milhões de pessoas possuem a mutação responsável pela doença (AKINGBOLA et al., 2014). As estimativas dos programas de triagem neonatal sugerem que aproximadamente 300.000 crianças nascem com a doença. Quando a mutação se expressa em homozigose, caracteriza-se a anemia falciforme (AF), forma mais comum e mais grave das doenças falciformes (MENEZES et al., 2013). Embora prevalente em todo o mundo devido à migração populacional, a AF é mais comum na África Subsaariana correspondendo a 2/3 dos nascimentos (Figura 1) (PIEL et al., 2017; PIETY et al., 2016).

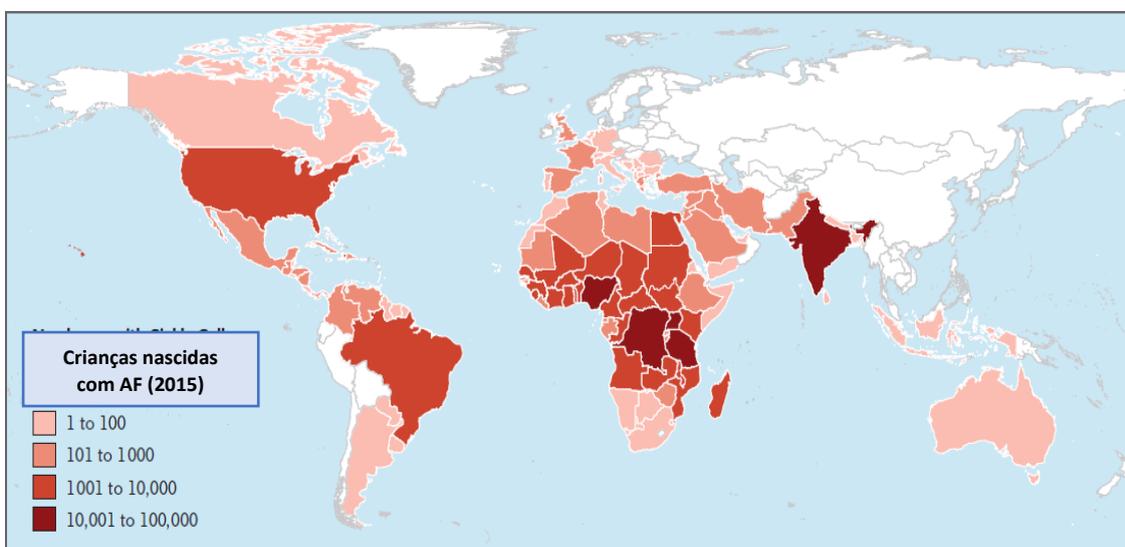


Figura 1: Número de crianças nascidas com Anemia Falciforme no mundo. Estimativas mostrando que a maioria desses nascimentos ocorrem na África e na Índia (PIEL et al., 2017).

No Brasil, a distribuição do alelo variante β^S é bem heterogênea afetando 25.000 a 30.000 indivíduos, porém apresenta maior incidência na população afrodescendente (SOARES et al., 2014). Dados do Ministério da Saúde apontam que aproximadamente 1000 crianças nascem com DF por ano, apresentando uma incidência de 1 em cada 2700 recém-nascidos. Em Pernambuco, essa

estimativa é de 1 em cada 1700 recém-nascidos (Brasil, 2013). Devido à sua alta incidência e mortalidade, o diagnóstico da AF tornou-se obrigatório desde 2001 no Brasil pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (HELENA; FERRAZ; MURAO, 2007)

2.1.2 Fisiopatologia

A anemia falciforme é causada por uma mutação pontual com substituição de uma adenina por uma timina ($GAG \rightarrow GTG$) no sexto códon do gene da globina β (*HBB*), localizado no cromossomo 11 (11p15.15) (PAIKARI; SHEEHAN, 2018). Essa alteração leva à troca de um ácido glutâmico por valina na cadeia β globínica ($\beta\text{Glu}^6 \rightarrow \text{Val}^6$), resultando em uma variante hemoglobínica anormal, a hemoglobina S (Hb S) (THEIN, 2017). O novo aminoácido substituído então, por não apresentar cadeia lateral carregada, interfere no processo de repulsão entre as hemoglobinas. Além disso, em condições de hipóxia, a Hb S se apresenta na forma tensionada, permitindo sua polimerização, com a formação de fibras densas e rígidas no interior dos eritrócitos. Esse acúmulo, por sua vez, danifica a membrana do eritrócito normal, causando alterações morfológicas que culminam, por fim, na falcização do mesmo (CONRAN; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009; FERRONE, 2016). A qualidade de vida e longevidade dos pacientes com AF são determinados pelas complicações que cada indivíduo apresenta, sendo influenciadas por diversos fatores, a depender da quantidade de polímeros de Hb S nas hemácias, além de fatores genéticos, como a co-herança com a alfa talassemia e a persistência hereditária da Hb F (PHHF), que irão diminuir a taxa de hemólise (DOMINGOS et al., 2014; HIGGS et al., 2008). Tendo em vista a fisiopatologia da doença, os pacientes podem ser divididos em dois subgrupos, sendo um caracterizado por eventos hemolíticos e o outro, por eventos vaso-oclusivos (Figura 2) (ADEKILE, 2013; STEINBERG, 2008).

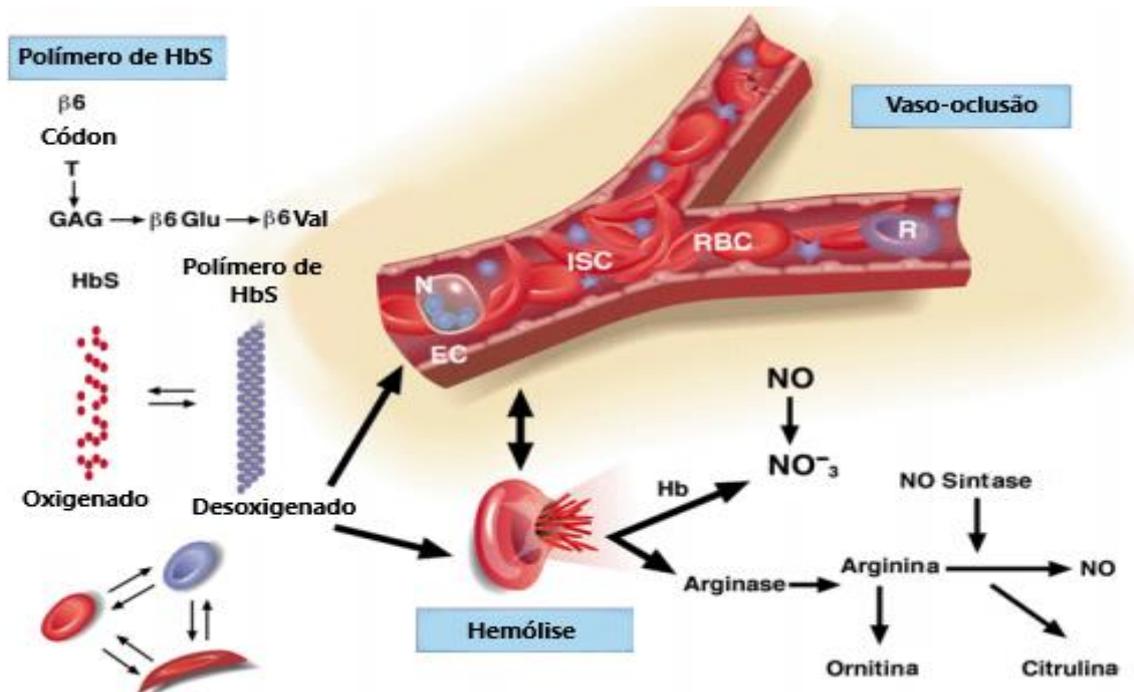


Figura 2: Fisiopatologia da anemia falciforme. No códon 6 da globina β , ocorre a troca de Adenina por Timina, formando o aminoácido valina, acarretando a formação do polímero de Hb S em condições de hipóxia. O acúmulo desses polímeros então provoca hemólise e alteração da forma dos eritrócitos, levando à vaso-oclusão. A hemoglobina livre e a arginase liberadas na hemólise diminuem a disponibilidade de óxido nítrico. A primeira, por convertê-lo em nitrato (NO_3^-) e a segunda, por consumir a arginina, substrato utilizado na produção de NO (Adaptado de STEINBERG, 2008).

Assim, as manifestações clínicas desses pacientes estão intimamente associadas a esses dois principais eventos, como úlceras maleolares, hipertensão pulmonar, priapismo e acidente vascular cerebral no primeiro grupo e síndrome torácica aguda, osteonecrose e crises álgicas no segundo (KATO et al., 2007).

Dentre as manifestações, a principal marca da anemia falciforme são as crises agudas de dor, também chamadas de crises vaso-oclusivas ou, ainda, crises álgicas (ARDUINI et al., 2017; MENEZES et al., 2013). Dados epidemiológicos inferem que aproximadamente 5% dos pacientes apresentam de 3 a 10 crises de dor severa por ano, podendo persistir de dias a meses, sendo, portanto, a principal causa de morbidade e internação desses indivíduos (UWAEZUOKE et al., 2018; YALE et al., 2000). Durante as crises agudas, como descrito por Diggs, em 1956: “os pacientes apresentam dor repentina na região

lombar ou em uma ou mais articulações ou em uma das extremidades. A dor pode ser localizada ou migratória e é contínua e latejante”, sendo, portanto, descrita como uma das formas de dor mais cruciantes que pode afetar um indivíduo (DIGGS, 1956; INUSA et al., 2019). Uma vez que essa manifestação está relacionada com o desenvolvimento da oclusão do fluxo sanguíneo, as dores são decorrentes de lesões denominadas “lesões de reperfusão”, onde um restabelecimento desordenado e desigual do fluxo sanguíneo, após um período de isquemia, resulta em lesão e necrose tecidual, levando em último caso à falência múltipla de órgãos (BALLAS et al., 2012; THEIN et al., 2017). Crises agudas recorrentes podem levar à cronicidade desses eventos, apresentando um caráter multifatorial, relacionado ao aumento prolongado da inflamação e necrose óssea, impactando negativamente a qualidade de vida desses pacientes (THEIN et al., 2017). Os gatilhos mais conhecidos das crises de dor incluem infecções, febre, desidratação e mudanças repentinas no clima (como o frio, vento e chuva), o que dificulta a resolução desses eventos (INUSA et al., 2019).

De acordo com a clínica dos pacientes falciformes, é indicado o uso do medicamento hidroxiuréia, utilizado como padrão-ouro para o tratamento das manifestações da AF (AGRAWAL et al., 2014). Isso se deve pelo fato desse medicamento promover a produção da Hb F, o que diminui a falcização das hemácias e também por diminuir a contagem total de leucócitos, reduzindo o processo de vaso-oclusão. No entanto, muitos pacientes ainda apresentam alguns efeitos colaterais que os fazem interromper o tratamento pelo desconforto causado (MCGANN et al., 2018).

Os eventos hemolíticos da anemia falciforme são subdivididos em extravasculares, mediados pelos macrófagos teciduais e baço, que reconhecem danos nas hemácias e as retiram da circulação; e intravasculares, decorrentes dos danos causados à membrana das hemácias pelos polímeros de Hb S, tornando-as mais frágeis e susceptíveis à lise, com consequente liberação de conteúdo eritrocitário. Ainda que um terço da destruição das hemácias ocorra no interior dos vasos, este processo tem maior contribuição no aumento dos níveis plasmáticos de Hb (HABARA et al., 2016; HEBBEL et al., 2009). Do mesmo modo, ocorre a liberação de arginase que, juntamente com a Hb, diminuem a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), um gás vasodilatador

produzido pelo endotélio, que atua como importante regulador da homeostase vascular por inibir a agregação plaquetária e expressão de moléculas de adesão (CONNES et al., 2016). Ademais, a falcização diminui a flexibilidade dos eritrócitos necessária para o fluxo entre os vasos de diferentes calibres e promove a exposição de proteínas e glicolípídios da face interna da membrana (AZAR; WONG, 2017; ZHOU; BEHYMER; GUCHHAIT, 2011). Como resultado, a hemólise leva a um ambiente de vasoconstrição e adesão endotelial exacerbado, favorecendo a ocorrência da vaso-oclusão (DUBERT et al., 2017; KATO et al., 2007).

Além da hemólise, os eventos vaso-oclusivos que ocorrem nos pacientes com AF são muito importantes para a fisiopatologia da doença. Por muito tempo se pensou que tais eventos ocorriam exclusivamente devido à obstrução física dos vasos causada pelas hemácias com formato de foice, no entanto, este é um processo bem complexo e que envolve muitos mecanismos que estão altamente relacionados com a hemólise e inflamação (CHIANG et al., 2005). Os mecanismos incluem múltiplas interações entre as moléculas de adesão e os receptores nas hemácias, leucócitos, plaquetas e células endoteliais, nos quais as proteínas plasmáticas e componentes da matriz subendotelial formam pontes entre as células sanguíneas. Além disso, os eritrócitos falciformes também apresentam mais moléculas de adesão em sua superfície em relação aos eritrócitos normais (HOPPE et al., 2017; KEIKHAEI et al., 2013; STEINBERG et al., 2012).

Diante dos danos causados à membrana dos eritrócitos falcizados, a exposição de moléculas de adesão em sua superfície extracelular aumenta sua capacidade de ligação ao endotélio, seja de forma direta ou por intermédio de proteínas plasmáticas. Essa adesão é mediada pela expressão de moléculas de adesão celular (CAM, traduzido de *cell adhesion molecules*), como a VCAM-1 e ICAM-1, na superfície das células endoteliais, reticulócitos e também dos leucócitos circulantes. A interação com o endotélio leva à ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB), bem como o aumento de citocinas pró-inflamatórias, que levam à super expressão das CAM, aumentando a severidade das crises vaso-oclusivas (Figura 3) (ALAGBE et al., 2017; MONCHANIN et al., 2008).

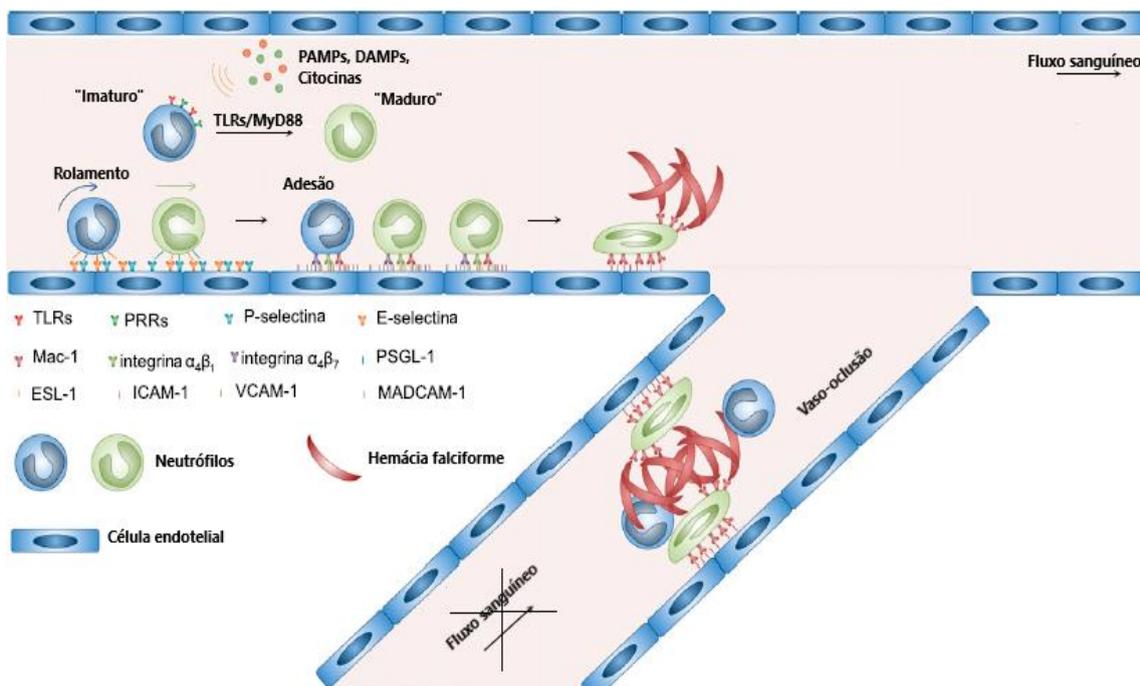


Figura 3: Modelo da fisiopatologia da vaso-occlusão. A partir de sinais da microbiota, desde citocinas a moléculas sinalizadoras de patógeno ou dano, os neutrófilos imaturos são ativados após reconhecimento pelos seus receptores. Assim, dá-se início ao processo de rolamento e adesão leucocitária, por meio de moléculas de adesão e seus respectivos receptores nos neutrófilos e nas células endoteliais. Diante disso, os neutrófilos aderidos podem se ligar a outros leucócitos, plaquetas e hemácias falcizadas, provocando, portanto, a vaso-occlusão. TLRs, receptores “*Toll-like*”; PRRs, Receptor de reconhecimento de padrão; Mac-1, antígeno de macrófago-1; PSGL-1, glicoproteína ligante-1 da P-selectina; ESL-1, ligante-1 da E-selectina; MADCAM-1, molécula de adesão da mucosa-1 (Adaptado de ZHANG et al., 2016).

2.2 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Assim como os eritrócitos, os leucócitos também apresentam um papel importante na vaso-occlusão por se aderirem ao endotélio, plaquetas e às próprias hemácias aderidas (MORRONE et al., 2018). Diante da ativação endotelial causada pelos eritrócitos falciformes, bem como o aumento de mediadores inflamatórios e agentes quimiotáticos produzidos pelo endotélio, ocorre um maior recrutamento, ativação e adesão dos leucócitos, que se ligam às hemácias e às células endoteliais. Uma vez que os leucócitos são maiores que as hemácias e apresentam um menor grau de deformação, sua aderência ao endotélio diminui drasticamente o fluxo sanguíneo, aumentando o tempo de transito e hipóxia, agravando o quadro de oclusão vascular (GARADAH et al., 2016; KAUL; FINNEGAN; BARABINO, 2009; ZHONG; YAZDANBAKHSH, 2018).

Concomitante à adesão leucocitária causada pela hiperativação celular, verifica-se um efeito copioso de produção de citocinas pró-inflamatórias por diversos tipos celulares, como as células endoteliais, monócitos e neutrófilos. Das citocinas produzidas, destacam-se as interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), devido às suas características de ativação endotelial, bem como ativação e recrutamento de leucócitos, aumentando a adesão celular e consequente perpetuação de eventos vaso-oclusivos (KEIKHAEI et al., 2013; SCHIMMEL et al., 2017).

A IL-1 β , assim como o TNF- α , estão associadas com a ativação de leucócitos, especialmente de monócitos e neutrófilos, estimulando uma maior migração celular e produção de citocinas, ativando por consequência mais células endoteliais (PITANGA et al., 2013; ZHANG et al., 2016). Além disso, essas citocinas aumentam a aderência ao endotélio por estimular a produção de mais moléculas de adesão, como selectinas, VCAM-1 e ICAM-1 (KEIKHAEI et al., 2013). Juntamente à TNF- α , a IL-8 atua como um potente ativador de neutrófilos, aumentando a quimiotaxia e recrutamento dos mesmos (CAJADO et al., 2011). IL-6, por sua vez, apresenta-se como 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; PITANGA et al., 2013; ZANETTE et al., 2019).

Assim, um ciclo de ativação celular repetida, adesão celular e produção de moléculas inflamatórias acarreta em um quadro inflamatório crônico, apresentando um aumento na contagem total de leucócitos e, consequentemente, maior produção de citocinas, levando a um ciclo repetitivo e cada vez mais agravante de oclusão vascular. (ANSARI et al., 2017; DOS SANTOS; CHIN, 2012).

Diante disso, uma vez que as células mononucleares e os neutrófilos são os leucócitos com maior atuação durante as crises vaso-oclusivas, a caracterização do perfil inflamatório dessas células torna-se um importante método para compreender o desdobramento dessa manifestação.

2.2.1 IL-1 β

A interleucina-1 β pertence ao grupo da IL-1, que engloba citocinas com funções imuno-regulatórias, pró-hematopoiéticas e pró-inflamatórias, tendo como principais efeitos o desenvolvimento e manutenção do processo inflamatório. Das citocinas presentes nesse grupo, a IL-1 β se apresenta como uma potente molécula pró-inflamatória, codificada pelo gene *IL1B*, contido no cromossomo 2 (2q14.1) (DEMBIC, 2015).

Os principais tipos celulares produtores de IL-1 β são macrófagos e monócitos ativados, ainda que neutrófilos, linfócitos e diversas outras células também a produzam em menor quantidade (TURNER et al., 2014). Diante disso, a partir do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a danos (DAMPs), bem como de diversos outros estímulos pró-inflamatórios, as células supracitadas são ativadas e secretam o precursor pro-IL-1 que, posteriormente, será clivado na forma ativa (IL-1 β) pela caspase-1, também conhecida como enzima conversora de IL-1 β (ICE). A partir daí, essa molécula pode se ligar aos seus dois tipos de receptores correspondentes nas células-alvo, sendo eles o IL-1R tipo 1 (apresentando as cadeias 1RI e 1RacP), responsável pela transmissão dos efeitos da IL-1 β , e o tipo 2 (1RIIa), atuando como supressor do sinal (DEMBIC, 2015; TURNER et al., 2014). Após a ativação do IL-1R, ocorre a transdução de sinal semelhante à dos receptores *Toll-like* (TLR), com recrutamento de complexos proteicos representados pelo fator 88 de diferenciação mieloide (MyD88) e quinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAKs). Com isso, ocorre a ativação do complexo fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6) por meio de ubiquitinação, resultando por fim na ativação da via do NF- κ B, da enzima janus quinase (JNK) e de proteino-quinases ativadas por mitógenos (MAPk) (PULUGULLA et al., 2018). A via do NF- κ B é iniciada com a fosforilação do seu precursor I κ B α , dissociando as subunidades que compõem o NF- κ B (p65 e p50). Assim, esse complexo é direcionado ao núcleo da célula, onde atua diretamente nos genes que sucedem os efeitos fisiológicos da citocina. Da mesma forma, a via das MAPK é ativada por fosforilação, que por sua vez ativam genes responsáveis pela expressão de citocinas pró-inflamatórias (Figura 4) (DEMBIC, 2015; GLUSHAKOVA et al., 2018; KRUMM; XIANG; DENG, 2014).

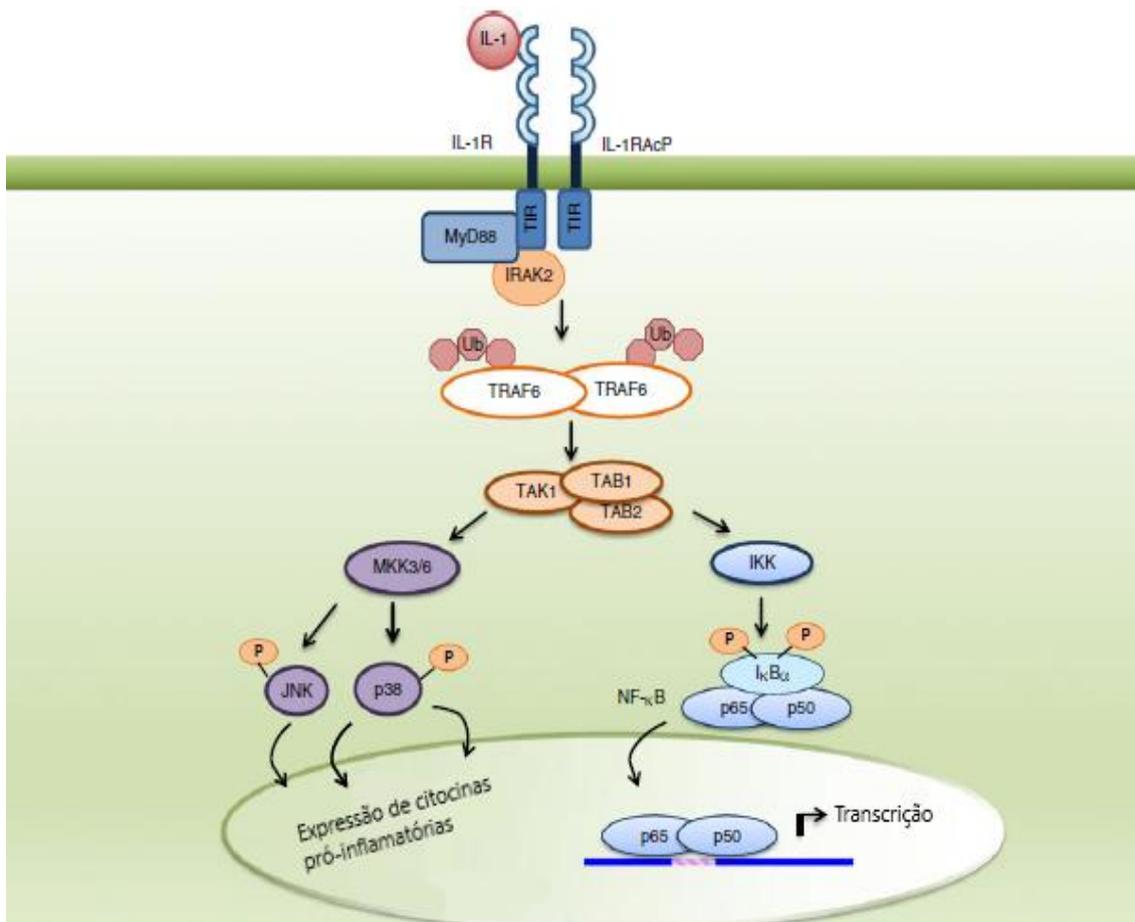


Figura 4: Via de sinalização da IL-1 β (Adaptado de TURNER et al., 2014).

2.2.2 IL-6

A interleucina-6, codificada pelo gene *IL6* no cromossomo 7 (7p15.3), é o principal membro da família que recebe seu nome, composta por citocinas que compartilham a subunidade gp130 do receptor de IL-6 (IL-6R) como via de sinalização. Essa citocina é apontada como uma das principais citocinas pró-inflamatórias por apresentar diversas funções, tendo um papel central na manutenção e integralização da defesa imune contra infecções pela produção de proteínas de fase aguda, fatores de diferenciação mieloide e pela proliferação celular, sendo associada a diversas doenças autoimunes e infecciosas, bem como a inflamações não infecciosas nos seres humanos (NARAZAKI; TANAKA; KISHIMOTO, 2017). Neutrófilos, monócitos e linfócitos sintetizam e secretam IL-6 a partir da estimulação dos TLRs após reconhecimento de PAMPs e DAMPs. (ROSE-JOHN; WINTHROP; CALABRESE, 2017).

Após ser secretada, a IL-6 pode atuar de duas maneiras nas células-alvo: por meio da sinalização clássica ou pela “trans sinalização”. No primeiro modelo, a molécula de IL-6 se liga à subunidade α do seu receptor (IL-6R), formando o complexo IL-6-IL-6R que, por sua vez, ativa a subunidade β (comumente conhecida como gp130), responsável pelo início da sinalização celular. A partir da dimerização das subunidades do receptor, ocorre a ativação da via JAK-STAT. Essa via resulta na ativação do transdutor de sinal STAT-3 por constante fosforilação, induzindo a expressão de genes pró-inflamatórios (DEMBIC, 2015; TURNER et al., 2014).

Apesar da gp130 ser expressa de forma ubíqua, a subunidade α é restrita a alguns tipos celulares, como os leucócitos. Assim, de forma alternativa, a IL-6 pode se ligar à forma solúvel da subunidade α do receptor (sIL-6R), formada após ação da proteína 17 com domínio de desintegrina e metaloproteinase (ADAM17). O complexo solúvel formado, por sua vez, pode ativar a gp130, seguindo a transdução de sinal intracelular. Dessa forma, células que expressam somente a subunidade β do receptor podem ser ativadas por esse mecanismo alternativo, denominado trans sinalização (Figura 5) (DEMBIC, 2015; DIKLIĆ et al., 2020; ROSE-JOHN; WINTHROP; CALABRESE, 2017; TURNER et al., 2014).

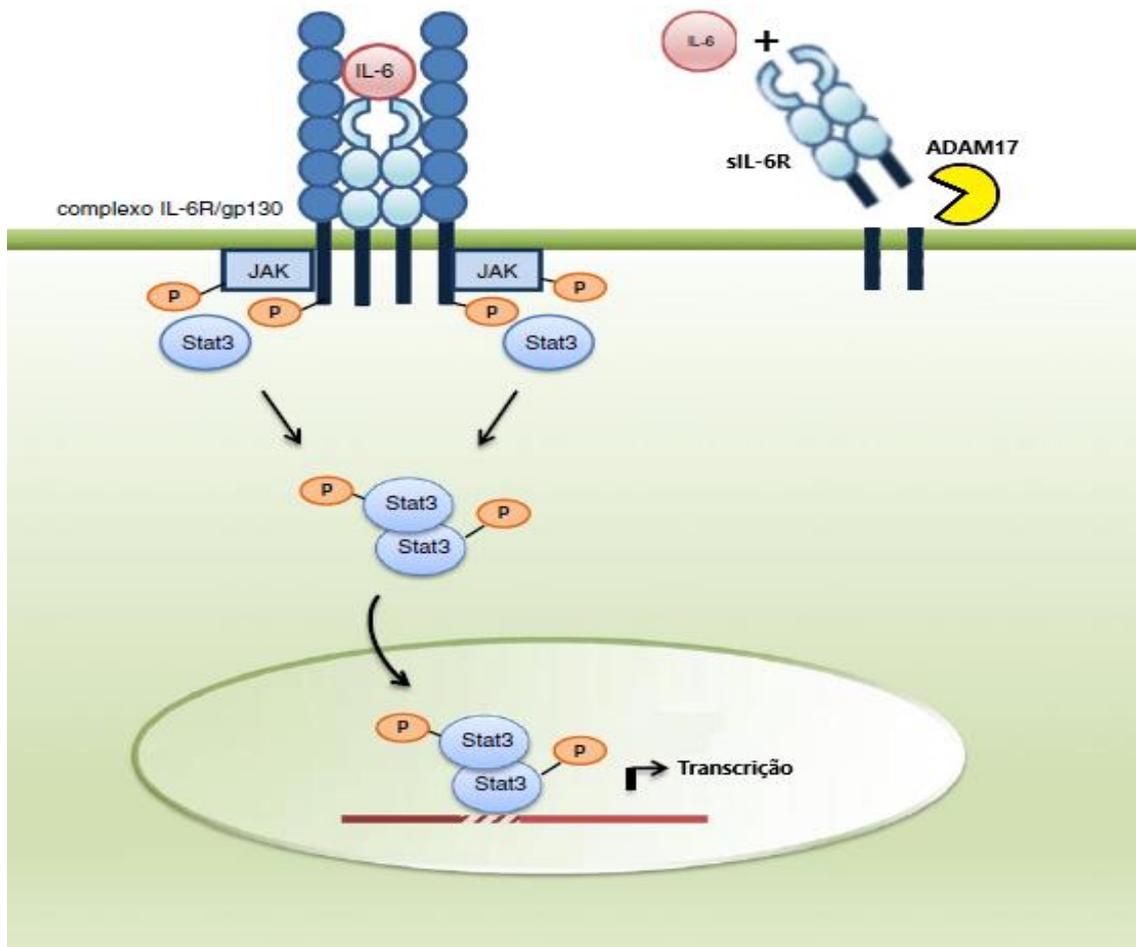


Figura 5: Via de sinalização da IL-6. Sinalização clássica da IL-6 à esquerda (A) e o modelo de trans-sinalização, à direita (B) (Adaptado de TURNER et al., 2014).

2.2.3 IL-8

A IL-8 pertence a um grupo especial de citocinas denominado de quimiocinas, inserida no subgrupo das CXC, que apresentam o primeiro par de cisteínas (C) separado por um aminoácido (X). Devido a isso, seu gene codificante, *IL8*, é também nomeado *CXCL8*, estando localizado no cromossomo 4 (4q13.3) (FITZGERALD ET AL., 2001).

A família das quimiocinas é responsável pela quimiotaxia, ou seja, responsável por controlar a migração direcionada das células imunes. Cada quimiocinas apresenta uma função específica diante desse contexto, no qual a IL-8 é a principal responsável pela migração dos neutrófilos ao sítio de ação, o que a torna uma citocina essencial na resposta inata. Sua produção é induzida a partir de diversos estímulos, como citocinas pró-inflamatórias e agentes indutores da resposta imune, sendo primariamente sintetizada por células

mononucleares, ainda que também seja produzida por múltiplos tipos celulares, como granulócitos e células endoteliais, dentre outros (HAMURO, 2001).

Esta citocina apresenta dois receptores funcionais, CXCR1 e CXCR2, ambos pertencentes à família dos receptores ligados à proteína G, estando altamente expressos em neutrófilos. Após o reconhecimento da IL-8 pelo receptor, ocorre a transdução do sinal mediante alteração na conformação da proteína G com predominante ativação de fosfolipase C β_2 (PLC β_2), adenilato ciclase e a proteína membro da família A do homólogo Ras (RhoA) (DEMBIC, 2015; ZWAHLEN; WALZ; ROT, 1993). Ao ser dissociada, a subunidade G α , associada ao ATP, ativa a adenilato ciclase com formação de AMPc, ativando as quinases do tipo A (PKA). Já a subunidade G $\beta\gamma$ ativa a PLC β_2 , que irá degradar os fosfolipídios em inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). Este último promove a ativação das quinases do tipo C (PKC) que, assim como a PKA, induzem a via das MAPKs, com formação de fatores de transcrição para genes pró-inflamatórios. O IP3, por sua vez, promove aumento das concentrações de cálcio intracelular, estimulando assim a exocitose, ou degranulação, dos neutrófilos. Além dessas funções, a proteína G ativada também estimula a RhoA a aumentar a produção de integrinas a partir da quinase N (PKN), aumentando assim a aderência celular, sendo esta a principal função da IL-8 (Figura 6) (MUKAIDA N. & MATSUSHIMA K., 1998; TURNER et al., 2014).

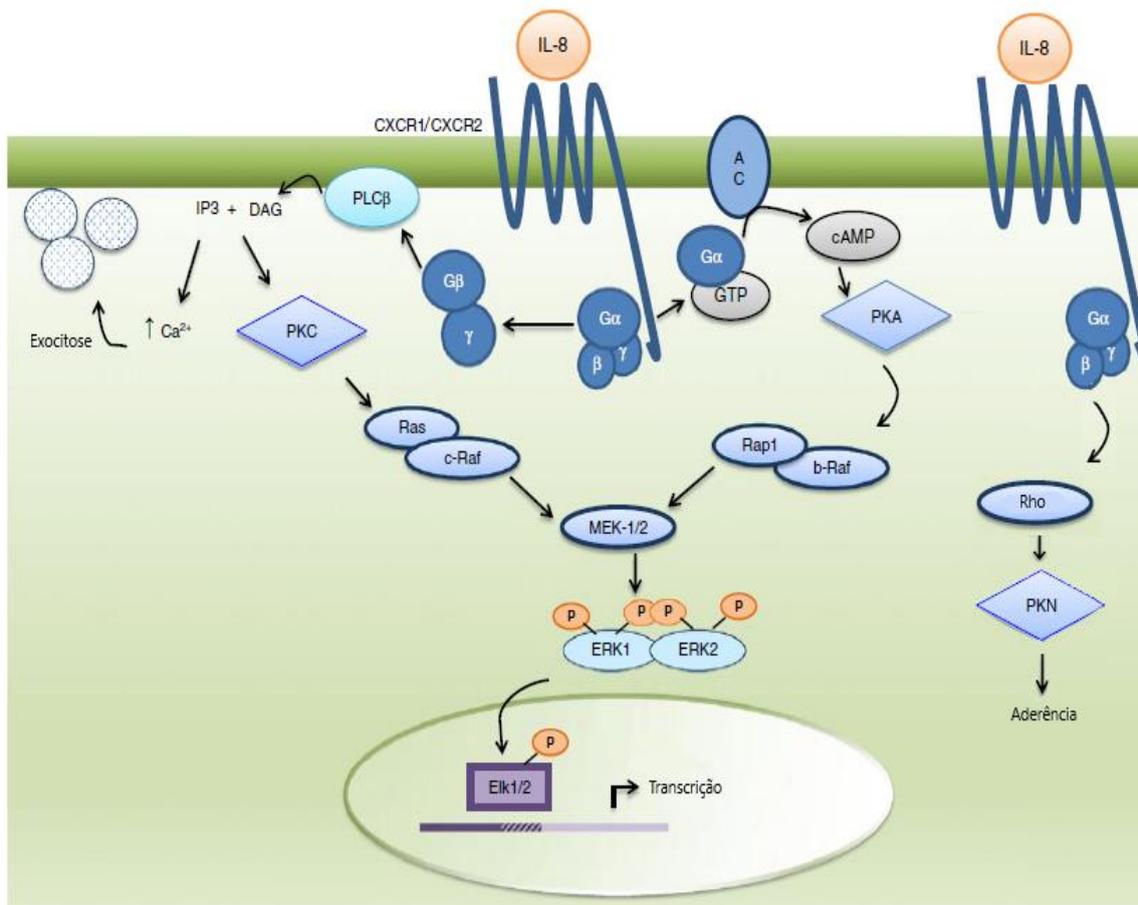


Figura 6: Via de sinalização da IL-8 (Adaptado de Turner et al., 2014).

2.2.4 TNF- α

Ainda que o fator de necrose tumoral tenha recebido esse nome por provocar a apoptose e necrose de células cancerígenas, esta citocina está fortemente relacionada com o desenvolvimento da resposta imune. Seu referido gene está localizado no cromossomo 6 (6p21.33) e, assim como as citocinas citadas anteriormente, o TNF- α é produzido por diversas células do sistema imune, como macrófagos, monócitos, linfócitos e neutrófilos, além de diversos outros tipos celulares (WU; HYMOWITZ, 2010).

Além de causar apoptose, em condições específicas, o TNF- α também estimula a expressão fatores de crescimento e transcrição, complexo principal de histocompatibilidade (MHC) nas células apresentadoras de antígenos, moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas (BANDEIRA et al., 2014; CLYDE; GLAUNSINGER, 2010) O TNF- α é sintetizado na forma de uma proteína transmembrana, que é posteriormente clivada na forma solúvel pela enzima

conversora de TNF- α (TACE, ou ADAM17), sendo ambas biologicamente ativas. As diversas funções apresentadas pelo TNF- α resultam da ativação de dois tipos de receptores, com vias de sinalização distintas. O receptor do tipo 1 (TNFR1) é constitutivamente expresso em todas as células, é ativado por ambas as formas de TNF- α e sua ativação está relacionada com a formação da resposta inflamatória e da degeneração tecidual. Diferentemente, o receptor do tipo 2 (TNFR2) é limitado a células específicas como neurônios, células endoteliais e do sistema imune. Além disso, é ativado majoritariamente pela forma transmembranar do TNF- α e a essa ativação estão atribuídos os efeitos homeostáticos (regeneração tecidual, proliferação e sobrevivência celular), bem como a iniciação da inflamação local (BALKWILL, 2009; BRADLEY, 2008).

Ao contrário dos receptores das citocinas anteriormente citadas, os TNFRs não apresentam atividade enzimática direta e por isso recrutam complexos enzimáticos a partir da sua ativação por meio de proteínas adaptadoras. Assim, ao ser ativado, o TNFR1 recruta a proteína TRADD (“domínio de morte” associado ao TNFR1), que por sua vez induz a formação de dois complexos enzimáticos, a depender das circunstâncias da célula: o complexo 1, que leva a efeitos inflamatórios e de homeostase celular; e o complexo 2, formado pela via das caspases, responsável pela apoptose e necrose em células malignas. O TNFR2 também estimula a composição do complexo 1, no entanto, esse estímulo ocorre mediante à proteína acessória TRAF2 (fator 2 associado ao TNFR) (Figura 7) (BALKWILL, 2009; TURNER et al., 2014). Uma vez ativadas, as proteínas TRADD e TRAF2 dão início à via das MAPKs (JNK e p38) e do NF- κ B, semelhante à IL-1 β , o que faz com que essas duas citocinas sejam frequentemente associadas por suas funções (KALLIOLIAS; IVASHKIV; PROGRAM, 2016).

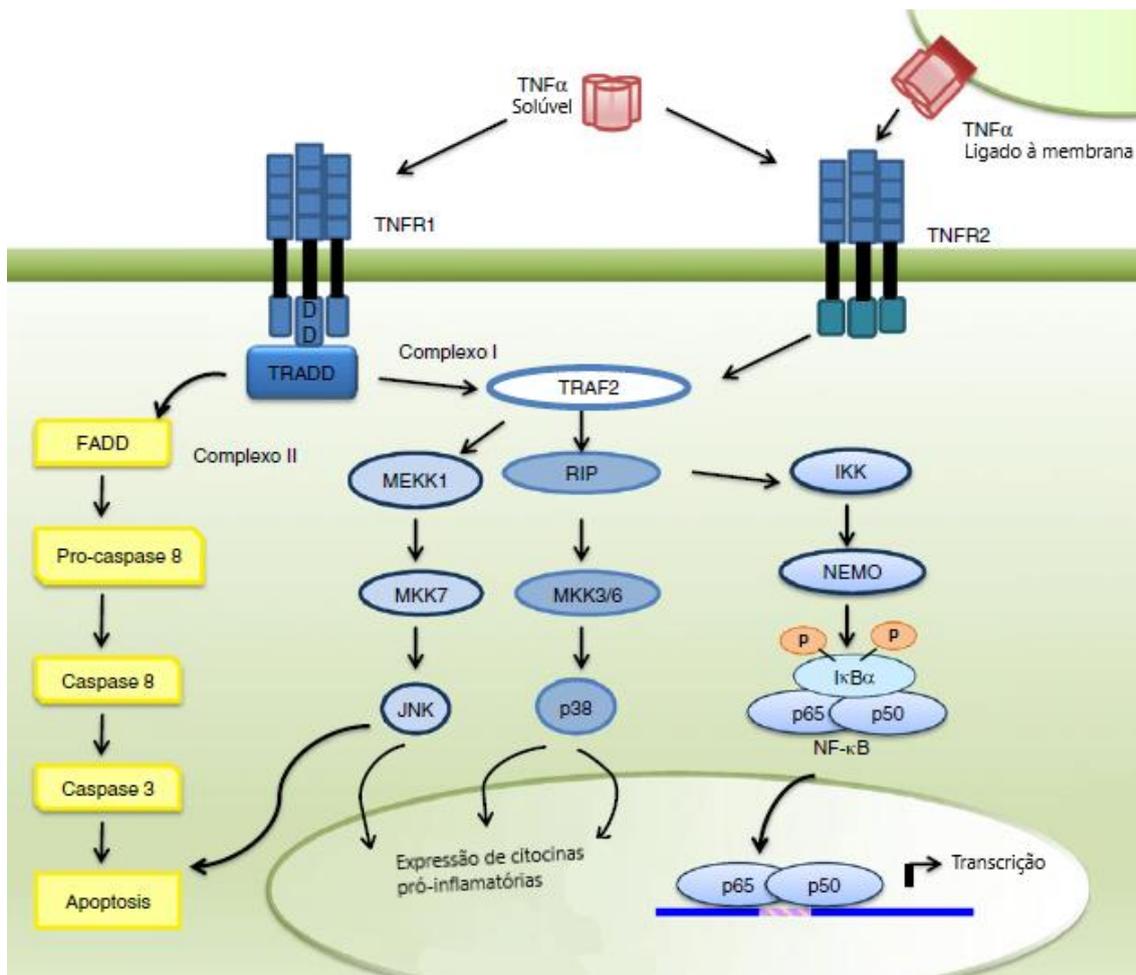


Figura 7: Via de sinalização do TNF- α (Adaptado de TURNER et al., 2014).

Embora a anemia falciforme decorra de uma alteração genética, essa doença passou a ser abordada também como um distúrbio de cunho inflamatório, uma vez que o agravamento de sua fisiopatologia está diretamente relacionado com processos inflamatórios, como aumento de leucócitos e produção de citocinas pró-inflamatórias (PLATT, 2000; TORRES et al., 2016). Diversos estudos comprovam a associação de moléculas pró-inflamatórias com manifestações da AF, especialmente as crises vaso-oclusivas (CARVALHO et al., 2018; KEIKHAEI et al., 2013; LANARO et al., 2009). Dessa forma, tendo em vista a atuação das citocinas aqui apresentadas no desenvolvimento da resposta inflamatória, a caracterização do perfil dessas citocinas durante as crises álgicas e o segmento pós crise torna-se um assunto relevante na compreensão dos mecanismos dessa complicação. Abaixo, encontra-se uma tabela (Tabela 1)

resumindo as quatro citocinas descritas, com suas principais fontes e respectivas funções.

Tabela 1: Citocinas, suas principais fontes e funções.

Citocina	Principal fonte	Célula-alvo	Principal função
IL-1β	Macrófagos e monócitos	Linfócitos B, T e células NK	Adesão, inflamação, proliferação e diferenciação
IL-6	Neutrófilos, monócitos e linfócitos	Neutrófilos e linfócitos	Diferenciação mielóide, produção de proteínas de fase aguda
IL-8	Células mononucleares	Neutrófilos	Quimiotaxia
TNF-α	Leucócitos em geral	Macrófagos e Neutrófilos	Adesão, inflamação e ativação da fagocitose

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de expressão dos genes e os níveis séricos de citocinas inflamatórias em amostras de pacientes com anemia falciforme durante e após crise vaso-oclusiva.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão dos genes *IL1B*, *IL6*, *IL8* e *TNFA* em células mononucleares e polimorfonucleares de pacientes com anemia falciforme durante e após crise vaso-oclusiva;
- Quantificar os níveis das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α no soro de pacientes com anemia falciforme durante e após crise vaso-oclusiva;
- Verificar a associação dos níveis plasmáticos e a expressão gênica das citocinas inflamatórias supracitadas com as crises vaso-oclusivas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

O grupo amostral foi constituído de 46 pacientes portadores de anemia falciforme (Hb SS), cadastrados e acompanhados no Hospital de Hematologia da Fundação HEMOPE (Recife – PE). Utilizamos como critério de exclusão os pacientes submetidos ao tratamento por hidroxiuréia e/ou regime de transfusão sanguínea, além de histórico de processos infecciosos, nos 3 meses que antecediam a coleta. As crises vaso-oclusivas foram definidas como crises de dor intensa em tórax, articulações ou extremidade dos membros superiores ou inferiores, em que o paciente necessita de internamento. De acordo com as características clínicas apresentadas, os pacientes foram classificados em 2 grupos, sendo o grupo caso dividido em dois subgrupos:

- I. Grupo caso: Composto por 18 pacientes com idade maior que 18 anos e que apresentaram relatos de crise vaso-oclusiva. Os pacientes foram coletados no momento do internamento por crise álgica característica, previamente à analgesia, (grupo CVO). Posteriormente, 8 desses 18 pacientes foram coletados 3 meses após alta médica da internação por crise álgica, compondo o subgrupo pós-crise (POS).
- II. Grupo controle: Composto por 28 pacientes com idade maior que 18 anos em estado estável, sem que apresentassem eventos agudos clínicos por pelo menos 3 meses anteriores à coleta (grupo SCAss).

A cada convocação feita por telefone ou durante as visitas de rotina, cerca de 10 ml de sangue periférico foram coletados e distribuídos em tubos a vácuo contendo EDTA como anticoagulante e tubos com ativador de coágulo. As amostras então foram conduzidas ao setor de Hematologia e Biologia Molecular do Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (LABCEN – UFPE) para a realização das análises moleculares.

4.2 DESENHO DO ESTUDO

O presente estudo, realizado no período de agosto/2017 a dezembro/2019, foi desenvolvido de acordo com dois tipos de análises, em que os pacientes em crise e pós crise foram comparados entre si e entre os pacientes do grupo controle. O trabalho está sendo desenvolvido na Universidade Federal

de Pernambuco, tendo a Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) como instituição coparticipante, de onde foram coletadas as amostras e realizadas as análises dos prontuários dos pacientes participantes.

4.3 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP/CCS/UFPE - N° do parecer: 2.418.989) (Anexo I). Após a aprovação, foi desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). A Fundação HEMOPE foi incluída como instituição coparticipante, pois os pacientes foram oriundos da mesma.

Os pacientes, após explicação do projeto, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pelo CEP (Anexo II).

4.4 ANÁLISE CLÍNICA E HEMATOLÓGICA

Os dados clínicos foram obtidos a partir da análise dos prontuários de acompanhamento médico dos pacientes que comparecem regularmente ao ambulatório de Hematologia da Fundação HEMOPE. Os dados hematológicos foram obtidos utilizando contador eletrônico de células (STKS, Coulter Corporation, FL, USA). A quantificação das hemoglobinas (Hb F, Hb A, Hb A₂ e Hb S) foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC – VARIANT / BIO-RAD, CA, USA).

4.5 ANÁLISE MOLECULAR

4.5.1 Isolamento de Células Mononucleares (CM) e Polimorfonucleares (PMN) do sangue periférico:

As amostras de sangue total de pacientes com AF foram coletadas em tubos de EDTA (5mL) e colocadas sobre duas camadas de Ficoll-Hypaque de densidades de 1.119 g/L e 1.077 g/L, de acordo com o protocolo estabelecido por English & Anderson (ENGLISH; ANDERSEN, 1974). Após a separação das CM e dos granulócitos por centrifugação a 700g durante 30 minutos, as células foram lavadas uma vez em PBS (pH 7,4). Foi utilizada uma solução de lise (10 min, 4°C, solução 155mM NH₄CL, 10mMKHCO₃) para lisar os eritrócitos contaminantes. As células foram então lavadas novamente com PBS e, após a centrifugação, os pelets de CM e PMN foram ressuspensos separadamente em reagente Trizol (1ml por 5-10x10⁶ células; Invitrogen, EUA) para a extração do mRNA.

4.5.2 Extração do RNA a partir das amostras de CM e PMN:

A extração foi procedida seguindo a técnica derivada pelo método desenvolvido por Chomczynsky e Sacchi (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). A integridade das amostras de RNA foi avaliada através de gel de agarose a 1,0% e posteriormente quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA). Em seguida, foram armazenadas a -80°C até o momento da sua utilização.

4.5.3 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real:

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada com a utilização do kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação dos níveis de transcritos foi realizada utilizando a metodologia de sondas TaqMan® Gene Expression Assay, seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados foram expressos pelo método do ΔC_t relativos aos genes da β -actina e do GAPDH, utilizados como controle endógenos.

4.5.4 Avaliação da dosagem sérica por ELISA:

As amostras de sangue total dos pacientes foram coletadas em tubos à vácuo sem anticoagulante, sendo centrifugadas a 1600 rpm por 15 minutos para separação do soro, posteriormente armazenado a -80°C até o momento de sua utilização. As concentrações séricas das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α foram mensuradas a partir de kits de ELISA (BD Biosciences, para IL-1 β , IL-6 e TNF- α ; eBiosciences, para IL-8), de acordo com as instruções dos fabricantes.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características clínico-laboratoriais dos pacientes foram mostradas descritivamente. O teste t de Student foi utilizado para comparação entre as variáveis das amostras pareadas e o teste de Mann-Whitney foi realizado para comparações entre as variáveis independentes. Todos os valores de P foram ajustados para os dois lados com nível de significância a 0,05. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPAD Prism 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

Após acompanhamento dos pacientes portadores de anemia falciforme que compareceram ao ambulatório e ao serviço de pronto atendimento do HEMOPE, 46 indivíduos foram selecionados para a pesquisa. Destes pacientes, 28 (61%) se enquadraram no grupo controle e 18 (39%) foram do grupo caso, sendo 8 do subgrupo pós-crise, cuja mediana de idade foi de 29 anos (19 – 56). Os resultados da caracterização laboratorial e demográfica estão descritos nas tabelas 1 e 2.

Tabela 2: Caracterização laboratorial dos pacientes incluídos no estudo separados por grupo.

Características laboratoriais	SCAss (28)	CVO (18)	POS (8)
Hemácias ($\times 10^2$ células/ μ L)	2,5 \pm 0,3	2,6 \pm 0,3	2,6 \pm 0,4
Hemoglobina (g/dL)	7,6 \pm 1,2	7,8 \pm 1,1	8,1 \pm 0,7
Hematócrito (%)	22,7 \pm 3,1	23,3 \pm 3,5	23,7 \pm 1,6
VCM (fL)	90,1 \pm 8,3	89,4 \pm 6,8	89,1 \pm 7,0
HCM (g/dL)	30,3 \pm 3,3	30,7 \pm 2,9	31,8 \pm 3,2
Leucócitos ($\times 10^6$ /L)	10,3 \pm 2,8	17,1 \pm 7,0	11,3 \pm 4,1
Plaquetas ($\times 10^9$ /L)	437,5 \pm 105,2	426,6 \pm 119,9	451,8 \pm 136,6
Reticulócitos (%)	8,5 \pm 4,9	10,6 \pm 6,8	12,9 \pm 8,9
Bilirrubina Total (mg/dL)	4,2 \pm 2,9	3,6 \pm 2,2	3,6 \pm 1,6
Bilirrubina indireta (mg/dL)	3,4 \pm 2,6	2,6 \pm 1,8	3,0 \pm 1,7
LDH (U/L)	958,2 \pm 587,0	800,2 \pm 400,2	774,5 \pm 435,8

VCM, Volume corpuscular médio; HCM, Hemoglobina corpuscular média; Hb F, Hemoglobina fetal; LDH, Lactato desidrogenase. Os resultados estão expressos pela média \pm desvio padrão.

Tabela 3: Caracterização demográfica dos pacientes incluídos no estudo.

Caracterização dos pacientes	n (%) (n = 46)
Sexo	
Masculino	22 (48,0%)
Feminino	24 (52,0%)
Idade	
Mediana (anos)	29
Intervalo (anos)	19 – 56

5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE IL1B, IL6, IL8 E TNFA PELAS CÉLULAS MONONUCLEARES

Inicialmente, foram comparados os valores da expressão dos genes IL1B, IL6, IL8 e TNFA pelas células mononucleares entre os pacientes em crise (CVO) e controle (SCAss), e entre os pacientes pós-crise (POS) e controle. Em ambos os casos, não foi observada nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos estudados, uma vez que nenhum dos valores de P estiveram abaixo de 0,05 (Figura 8). Em seguida, a expressão dos mesmos genes foi comparada entre os 8 pacientes que se apresentaram no estado de crise e pós-crise, de forma pareada. Da mesma forma que a análise anterior, não houve diferença estatística entre eles (Figura 9).

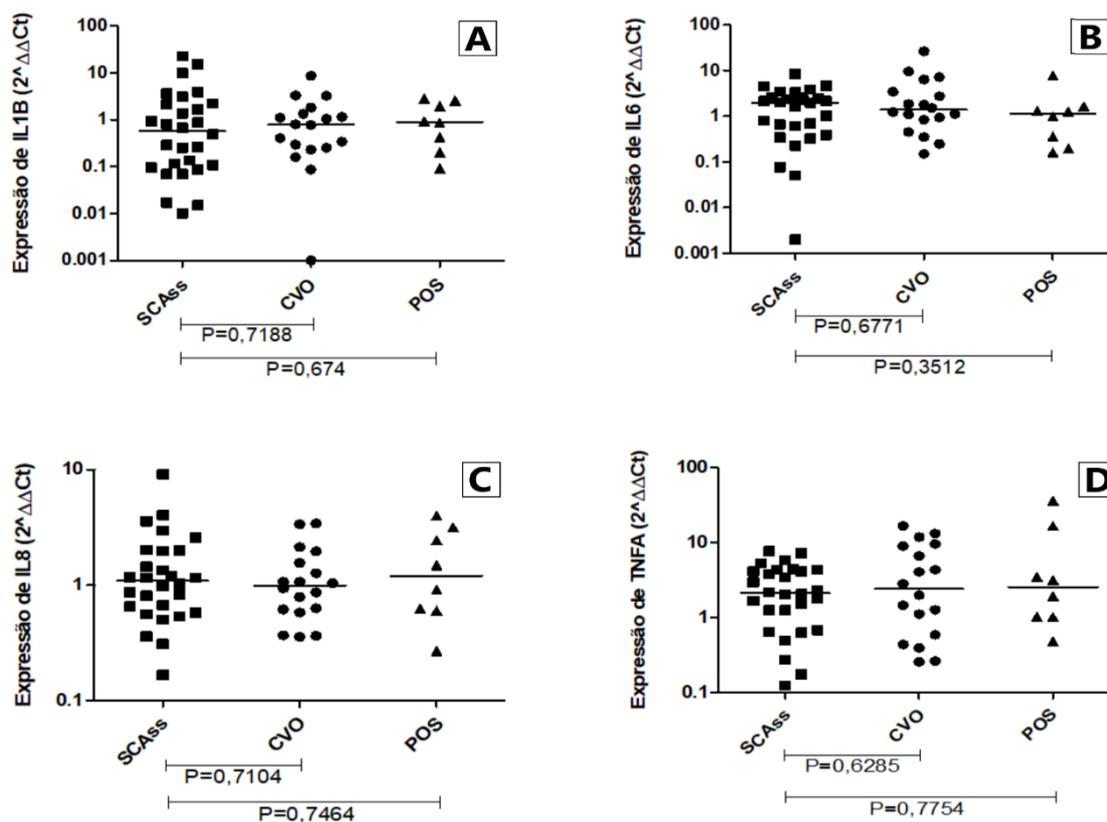


Figura 8: Expressão dos genes IL1B (A), IL6 (B), IL8 (C) e TNFA (D) pelas CM entre grupos não pareados. Os valores de P estão associados às análises entre os grupos SCAss x CVO e SCAss x POS. As barras horizontais representam a mediana dos valores obtidos. CVO, grupo dos pacientes em crise vaso-oclusiva; SCAss, grupo dos pacientes *steady state*; POS, grupo dos pacientes pós-crise.

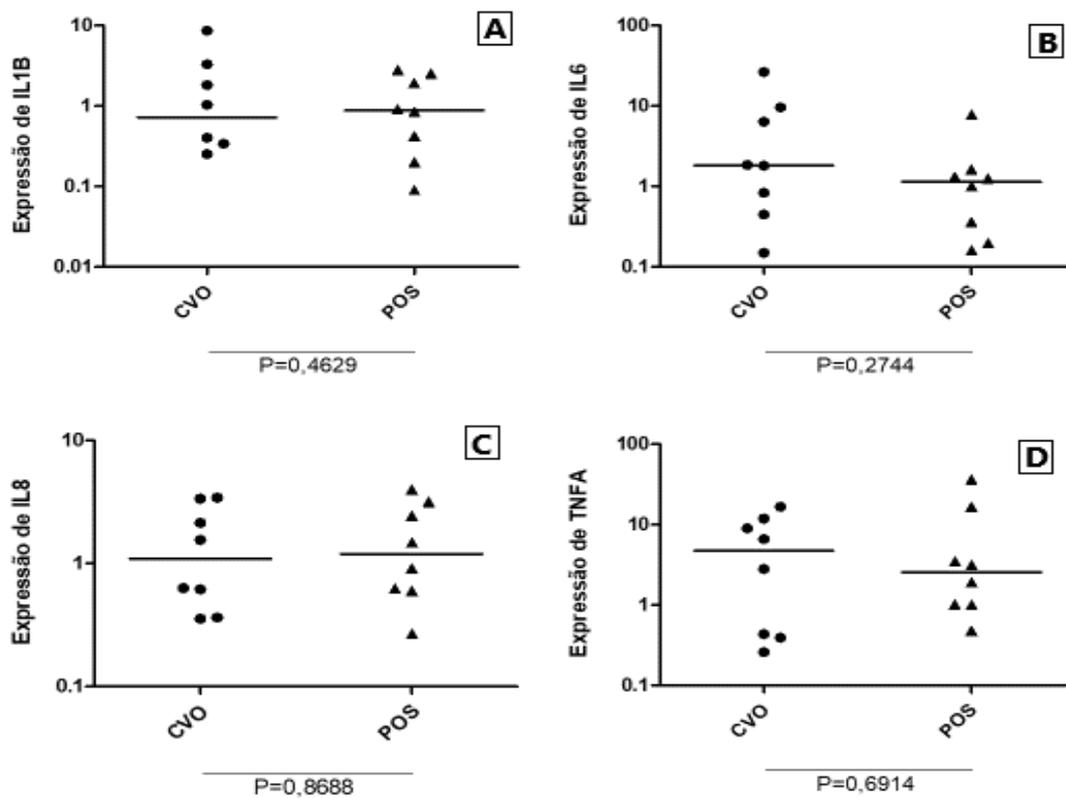


Figura 9: Expressão dos genes IL1B (A), IL6 (B), IL8 (C) e TNFA (D) pelas CM entre grupos pareados. Os valores de P foram obtidos pela análise entre os grupos CVO x POS.

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE IL1B, IL6, IL8 E TNFA PELAS CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES

As mesmas comparações executadas com os monócitos também foram realizadas para os polimorfonucleares. Como pode ser observado, nos quatro genes estudados houve diferença estatística quando comparados os grupos SCAss x CVO e SCAss x POS (Figura 10), sendo $P=0,0381$ o maior valor obtido (Figura 10-D), entre os grupos pós-crise e *steady state* para o TNFA. No entanto, ao serem analisadas as expressões gênicas nos grupos pareados (Figura 11), apenas o gene IL6 apresentou significância estatística ($P=0,0175$), como observado na Figura 11-B.

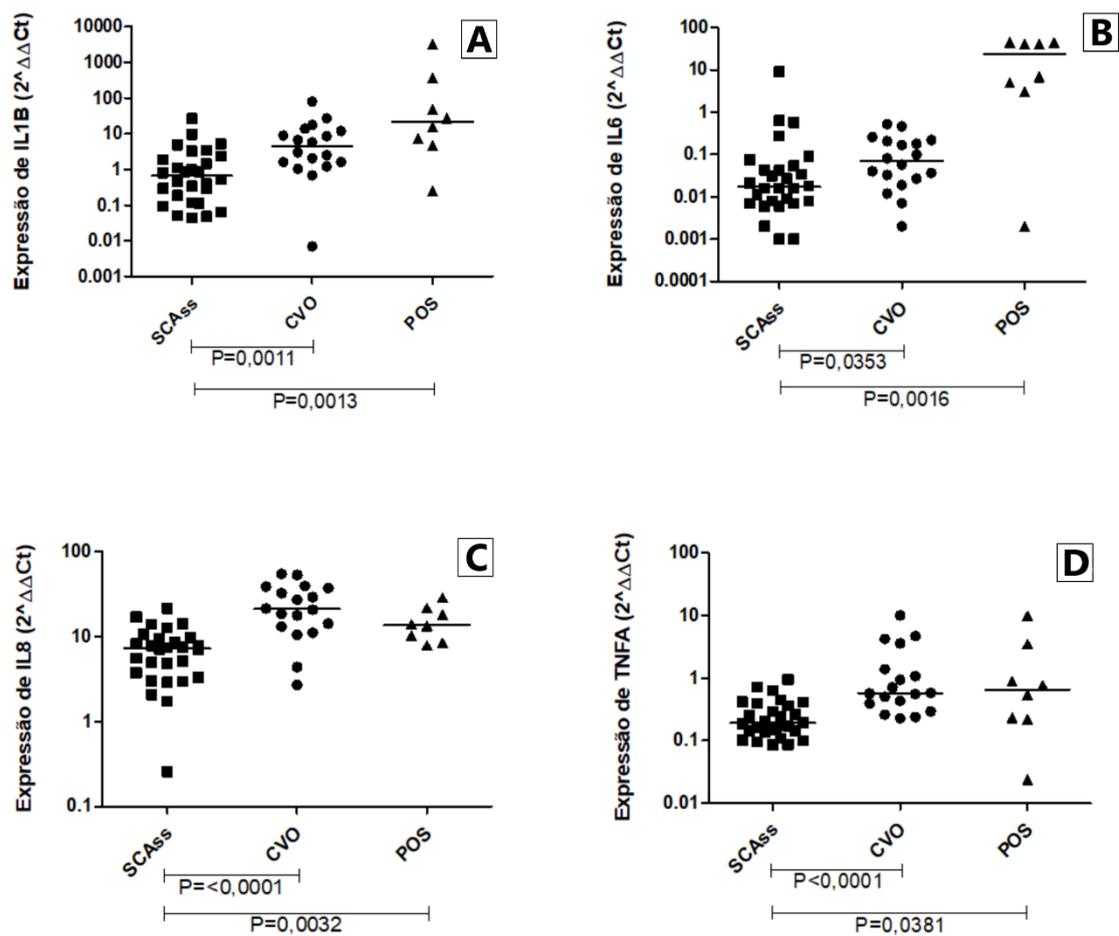


Figura 10: Expressão dos genes IL1B (A), IL6 (B), IL8 (C) e TNFA (D) pelos PMN entre grupos não pareados. Valores abaixo de 0,0001 não puderam ser calculados com exatidão, atribuindo-se então o valor de “<0,0001”, como ocorre em (C) e (D).

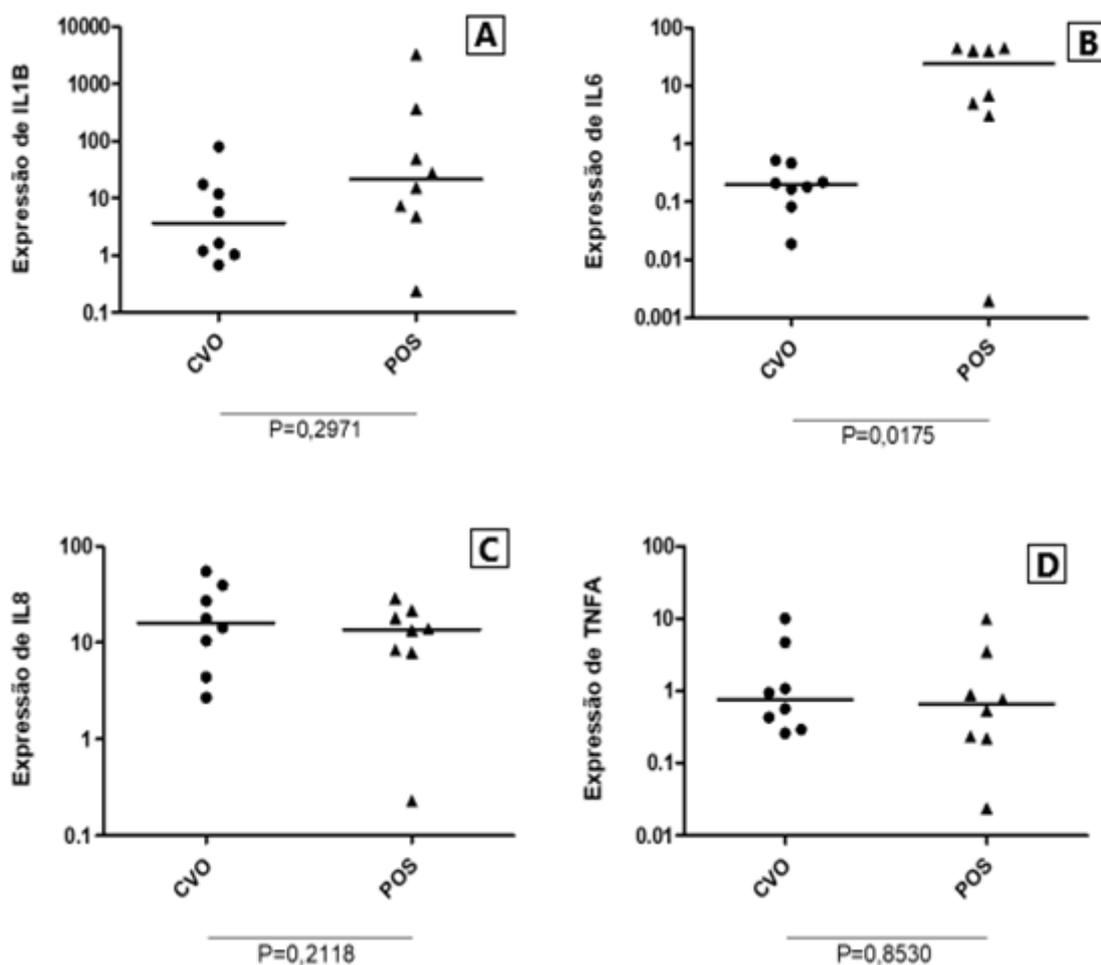


Figura 11: Expressão dos genes IL1B (A), IL6 (B), IL8 (C) e TNFA (D) pelos PMN entre grupos pareados.

5.4 ANÁLISE DA DOSAGEM SÉRICA DAS CITOCINAS IL-1B, IL-6, IL-8 E TNF-A

Foram realizadas as dosagens das concentrações das quatro citocinas no soro dos pacientes, com comparação entre os grupos SCAss x CVO e SCAss x POS. No entanto, somente a IL-8 apresentou um perfil de dosagem aceitável nos três grupos, apresentando uma diferença significativa de expressão proteica entre o grupo em crise e controle (Figura 12-C), com valor de $P=0,0009$. As demais citocinas, no entanto, apresentaram valores abaixo dos limites de detecção do kit na maioria dos pacientes em todos os três grupos, sendo, portanto, admitidos os valores iguais ao limite inferior de detecção. Dessa forma,

não foi possível observar valores estatísticos significativos para nenhuma das três citocinas restantes (Figura 12-A, B e D).

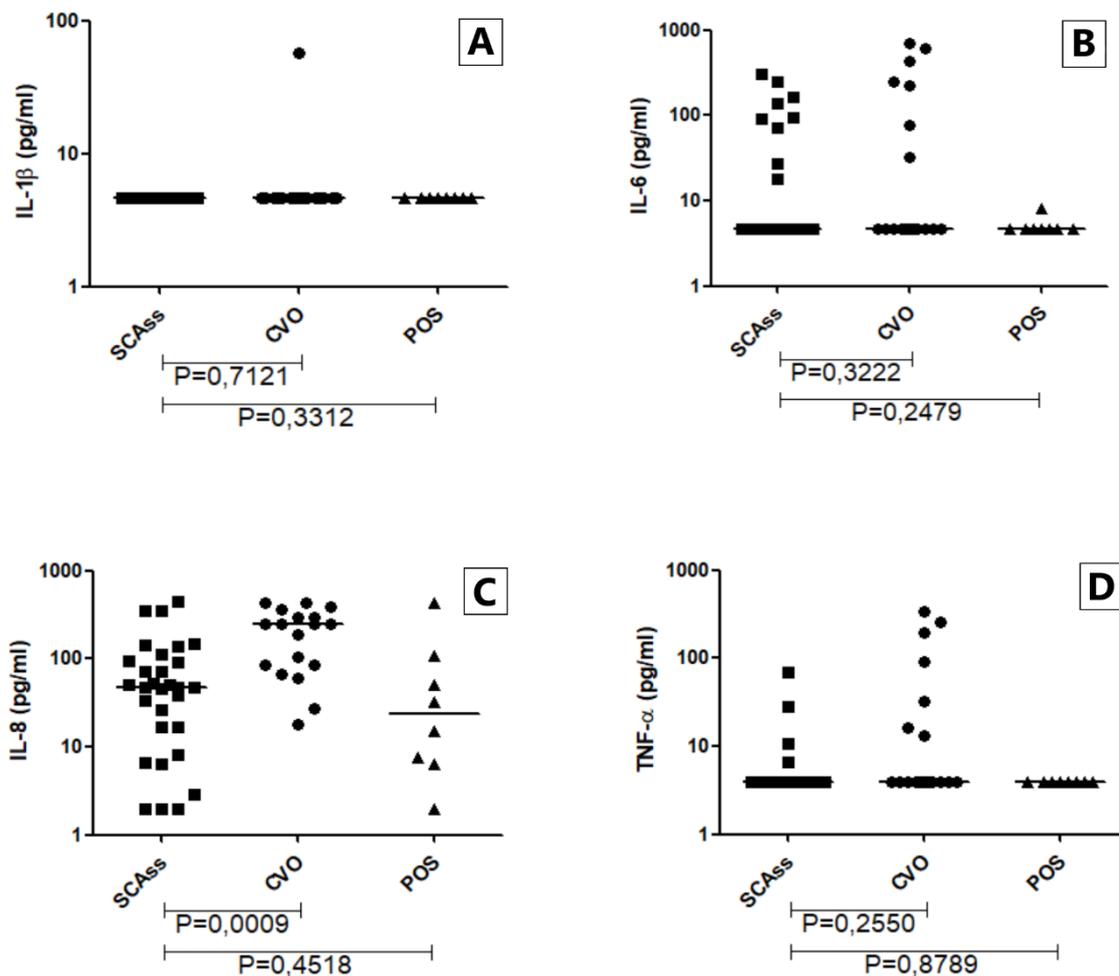


Figura 12: Dosagem sérica das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α . Valores abaixo do limite de detecção foram igualados aos valores de referência dos kits.

6. DISCUSSÃO

A anemia falciforme é uma doença mundialmente distribuída, de grande importância clínica devido ao seu alto grau de mortalidade, apresentando como manifestação mais prevalente as crises vaso-oclusivas. A vaso-oclusão, por sua vez, é um processo bastante complexo e multifatorial, em que a inflamação desempenha uma importante função, pela ativação de leucócitos e produção de citocinas e moléculas de adesão que mantêm o ambiente inflamatório.

Apesar do caráter genético da anemia falciforme, esta doença é caracterizada por um estado inflamatório crônico (PLATT, 2000). De acordo com isso, é possível atestar que as manifestações apresentadas pelos portadores da doença estão intimamente ligadas à produção de moléculas pró-inflamatórias. Assim, diversas citocinas foram demonstradas estar envolvidas na fisiopatologia da AF, constatando que além do estado inflamatório aumentado nesses indivíduos em estado estável, é possível observar um aumento da resposta do sistema imune durante os episódios de crise vaso-oclusiva, uma vez que a vaso-oclusão decorre de lesão tecidual e ativação celular, incluindo leucócitos (PITANGA et al., 2013). Diante dos mediadores secretados por essas células, a IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α apresentam ser de suma importância nesse processo, por estarem consideravelmente aumentadas no soro desses pacientes, sendo bastante estudadas na anemia falciforme (PITANGA et al., 2013; TORRES et al., 2016).

Ainda que diversos estudos tenham avaliado as expressões dessas citocinas na anemia falciforme, ainda há diversos conflitos entre os resultados apresentados, mesmo que alguns deles sejam complementares. Isso se deve, provavelmente, à diferença da população estudada e aos critérios utilizados para a composição dos pacientes estudados. De acordo com alguns estudos, há um aumento na expressão gênica de TNF- α e IL-8 em células mononucleares e polimorfonucleares, bem como sua síntese proteica, em pacientes portadores de anemia falciforme quando comparados a pacientes saudáveis (LANARO et al., 2009). Além disso, foi observado um aumento nas concentrações séricas de TNF- α , IL-8 e IL-6 em portadores da AF e aumento de IL-6 em pacientes durante a crise vaso-oclusiva quando comparados a pacientes estáveis (KEIKHAEI et al.,

2013; PATHARE et al., 2004). Recentemente, um estudo de Carvalho e colaboradores apontou que nos pacientes durante a crise vaso-oclusiva, as quatro citocinas citadas anteriormente se apresentavam consideravelmente elevadas quando comparadas a indivíduos saudáveis. Quando comparados a pacientes estáveis, somente a IL-1 β , IL-6 e TNF- α apresentaram-se mais elevadas (CARVALHO et al., 2018).

Visto que os leucócitos se apresentam como potentes produtores de citocinas, os mesmos foram divididos nos dois grandes grupos celulares que os compõe: as células mononucleares, representada principalmente pelos monócitos e linfócitos, e os granulócitos polimorfonucleares, majoritariamente representados pelos neutrófilos (ZHANG et al., 2016).

Na anemia falciforme, foi demonstrado que os monócitos permanecem ativados devido à ativação endotelial, permitindo um perfil inflamatório marcante pela ativação da via do NF-kB e produção de citocinas relacionadas à adesão celular, sobretudo a IL-1 β , e TNF- α , além de citocinas quimiotáticas e potencializadoras da inflamação, como a IL-8 e IL-6 (LIU et al., 2019; ZHANG et al., 2016). Como visto anteriormente, uma vez que a AF se apresenta também como uma doença inflamatória, é de se esperar um aumento da expressão de citocinas inflamatórias pelos monócitos, bem como uma maior ativação monocitária quando comparados com pacientes saudáveis, como pode ser visto em estudos previamente citados (GUARDA et al., 2019; KEIKHAEI et al., 2013; LANARO et al., 2009; ZHANG et al., 2016). No Entanto, nosso estudo demonstrou que a expressão das citocinas estudadas pelas células mononucleares se mostrou equiparável entre os grupos em crise, pós crise e em estado estável. Corroborando com estudos de Belcher e colaboradores, ainda que os monócitos dos pacientes falciformes apresentem um perfil inflamatório aumentado em relação a pacientes saudáveis, não há diferença considerável quanto à sua ativação entre pacientes estáveis e em crise (BELCHER et al., 2000). Sendo assim, ainda que os monócitos apresentem um aumento de expressão e síntese de mediadores inflamatórios quando comparados a pacientes saudáveis, desempenhando um papel importante na instalação do

processo inflamatório, sua atuação se mantém relativamente constante nos segmentos da vaso-oclusão.

Paralelamente aos monócitos, os neutrófilos se apresentam como o leucócito mais abundante no sangue, tendo um aumento considerável durante processos inflamatórios (JONES et al., 2016; LIEW; KUBES, 2019). Mediante os danos causados pelos eritrócitos falcizados e o ambiente propício à adesão e inflamação, os neutrófilos se encontram ativados na AF, com grande exposição de moléculas de adesão e produção de citocinas, sendo considerada a principal célula responsável pelo processo inflamatório (ZHANG et al., 2016). Assim, a formação de agregados de eritrócitos e plaquetas com neutrófilos se torna um evento marcante, uma vez que essa interação mantém a ativação neutrofílica, prolongando o microambiente inflamatório da vaso-oclusão (MATTE et al., 2019; ONYEKWELU et al., 2019; POLANOWSKA-GRABOWSKA et al., 2010) De forma complementar, nosso estudo mostrou uma expressão aumentada das citocinas pró-inflamatórias pelos granulócitos tanto no momento da crise quanto após a crise, em comparação aos pacientes controle. Dessa forma, por mais que os monócitos estejam também ativados, a formação de agregados ocorre com maior frequência entre os neutrófilos, mantendo sua ativação e síntese exacerbada de citocinas, dando a eles um destaque na promoção e manutenção da vaso-oclusão (POLANOWSKA-GRABOWSKA et al., 2010; ZHANG et al., 2016).

Adicionalmente, foi possível observar que não houve diferença significativa na expressão das citocinas pelas CM entre o momento pós crise e durante a crise. No entanto, foi constatada uma desigualdade significativa somente na expressão de IL-6 pelos granulócitos, sendo esta citocina mais expressa durante a crise vaso-oclusiva ($P=0,0175$), salientando a participação dessa citocina no processo inflamatório. A interleucina-6 é uma citocina notável em doenças imunes e processos inflamatórios crônicos, sendo considerada uma molécula chave no desenvolvimento de patologias de cunho imunológico (JONES; JENKINS, 2018; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014). Uma vez que a IL-6 leva à produção de proteínas de fase aguda e proliferação celular, principalmente as do segmento mielóide, sua elevação no soro está relacionada

com o agravamento das complicações inflamatórias em diversas doenças (JORDAN et al., 2017). Segundo um estudo de Zhao e colaboradores, dosagens elevadas de IL-6 são essenciais para a inflamação sistêmica e lesões de múltiplos órgãos na doença falciforme. Segundo esse estudo, foi possível observar que esta citocina, frente a diversas outras estudadas, foi a que apresentou maior elevação sérica em modelos murínicos portadores de doença falciforme, demonstrando a importância dessa citocina para o agravamento dessa doença (ZHAO et al., 2018). Estes dados corroboram com os resultados obtidos em nosso estudo, uma vez que além do seu aumento durante a crise, os pacientes pós crise continuam com uma elevada expressão dessa citocina.

Estudos recentes demonstraram que os neutrófilos permanecem com características pró-inflamatórias ativas após a resolução da crise, mesmo com intervenção farmacológica indicada para as crises de dor, como no caso da hidroxiuréia (BARBU et al., 2019, BARBU et al., 2020). A hidroxiuréia tem por efeito a diminuição da contagem total de leucócitos, reduzindo drasticamente o número de neutrófilos circulantes, além do estímulo da produção de Hb F, amenizando as complicações dos eventos vaso-oclusivos e hemolíticos da AF (GUARDA et al., 2019). No entanto, embora haja uma diminuição desses eventos, os neutrófilos restantes permanecem altamente ativados, o que justifica a alta expressão de citocinas mesmo após o tratamento. Diante das citocinas expressas, a IL-6 mostrou-se bastante expressa diante desse quadro (BARBU et al., 2020).

A alta expressão da IL-6 já foi anteriormente relacionada com a duração das crises (SARRAY et al., 2015). Além disso, a IL-6 é descrita como uma citocina chave no desenvolvimento de doenças imunológicas, podendo levar a um quadro severo de inflamação sistêmica por potencializar a ativação de células imunes e produção de citocinas, fazendo com que seja alvo de terapias em diversas doenças inflamatórias (JONES; MAERZ; BUCKNER, 2018; JONES; JENKINS, 2018; JORDAN et al., 2017; UNVER; MCALLISTER, 2018). Dessa forma, a conservação do estado pró-inflamatório mesmo após a crise vaso-oclusiva, caracterizado pela produção de IL-6 pelos neutrófilos, é um fator crucial na ocorrência de crises de repetição, podendo-se presumir que o prolongamento

da alta expressão dessa citocina permita a reestruturação das CVOs, levando a um quadro crônico de crise.

No que diz respeito às concentrações dessas citocinas no soro dos pacientes, a IL-1 β , IL-6 e TNF- α mostraram-se extremamente baixas, estando a maioria dos pacientes com dosagens abaixo dos limites inferiores de detecção. Dessa forma, devido ao número irrisório de pacientes que apresentaram dosagens aceitáveis, não foi possível observar nenhuma correlação das citocinas em nenhum dos três grupos analisados. Contrariamente a essas citocinas, a IL-8 mostrou um perfil semelhante aos observados em estudos prévios citados (CARVALHO et al., 2018; KEIKHAEI et al., 2013; PATHARE et al., 2004; SARRAY et al., 2015) em que pacientes em crise apresentam uma elevação significativa das concentrações dessa citocina em relação a pacientes em estado estável. Em razão dos processos inflamatórios observados na vaso-occlusão, é possível prever o aumento do perfil quimiotático, promovido essencialmente pela IL-8, para o recrutamento dos neutrófilos que, como demonstrado anteriormente, é a principal célula responsável pelo agravamento das CVOs. No momento pós crise, no entanto, não houve diferença significativa quando comparado com os pacientes estáveis, constatando que o nível de síntese dessa citocina retorna ao estado basal após a resolução da crise.

No entanto, os resultados referentes às dosagens das citocinas devem ser analisados com muita cautela, uma vez que a dosagem de IL-1 β , IL-6 e TNF- α necessite ser avaliada por métodos mais sensíveis ou por kit diferente do utilizado. Posto que essas citocinas pró-inflamatórias apresentam valores baixos em indivíduos saudáveis (KOELMAN et al., 2019), os resultados aqui apresentados não são condizentes com o quadro inflamatório dos pacientes estudados, entrando em contradição aos achados da IL-8 e de outros trabalhos citados anteriormente.

7. CONCLUSÕES

- A expressão de citocinas pró-inflamatórias pelas células mononucleares não apresenta diferença significativa entre pacientes em crise, pós-crise e *steady state*;
- Tanto os pacientes em crise como os pacientes pós-crise apresentam maior expressão de citocinas pró-inflamatórias pelos granulócitos quando comparada ao grupo controle (*steady state*);
- A expressão de IL-6 pelos granulócitos em pacientes pós-crise encontra-se mais elevada do que quando os mesmos estavam em crise vaso-oclusiva;
- As concentrações séricas de IL-8 apresentam-se elevadas no momento da crise vaso-oclusiva quando comparadas aos pacientes estáveis e pós crise;

REFERÊNCIAS

- ADEKILE, A. D. What's new in the pathophysiology of sickle cell disease? **Medical Principles and Practice**, v. 22, n. 4, p. 311–312, 2013.
- AGRAWAL, R. K. et al. Hydroxyurea in sickle cell disease: Drug review. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 30, n. 2, p. 91–96, 2014.
- AKINGBOLA, T. S. et al. Comparison of Patients from Nigeria and the USA Highlights Modifiable Risk Factors for Sickle Cell Anemia Complications. **Hemoglobin**, v. 38, n. 4, p. 236–243, ago. 2014.
- ALAGBE, A. E. 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**, n. December, p. 0–1, 2017.
- ANSARI, J. et al. Sickle cell disease: a malady beyond a hemoglobin defect in cerebrovascular disease. **Expert review of hematology**, v. 4086, n. December 2017, p. 1–11, 2017.
- ARDUINI, G. A. O.; RODRIGUES, L. P.; TROVÓ DE MARQUI, A. B. Mortality by sickle cell disease in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 1, p. 52–56, 2017.
- AZAR, S.; WONG, T. E. **Sickle Cell Disease: A Brief Update** **Medical Clinics of North America** W.B. Saunders, , 1 mar. 2017.
- BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361–371, 2009.
- BALLAS, SAMIR K., GUPTA K., GRAVES-ADAMS, P. Sickle Cell Pain : A Critical Reappraisal. **Blood**, v. 120, n. 18, p. 3647–3657, 2012.
- BANDEIRA, I. C. J. et al. Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB*S haplotype. **Cytokine**, v. 65, n. 2, p. 217–221, 2014.
- BARBU, E. A. et al. Neutrophils remain detrimentally active in hydroxyurea-treated patients with sickle cell disease. **PLoS one**, v. 14, n. 12, p. e0226583, 2019.
- BARBU, E. A. et al. Pro-inflammatory cytokines associate with NETosis during sickle cell vaso-occlusive crises. **Cytokine**, v. 127, n. November 2019, p. 154933, 2020.
- BELCHER, J. D. et al. Activated monocytes in sickle cell disease: Potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. **Blood**, v. 96, n. 7, p. 2451–2459, 2000.

BRADLEY, J. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal of Pathology**, v. 214, p. 149–160, 2008.

CAJADO, C. et al. TNF-alpha and IL-8: Serum levels and gene polymorphisms (-308G>A and -251A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. **Cytokine**, v. 56, n. 2, p. 312–317, 2011.

CARVALHO, M. O. S. et al. Inflammatory mediators in sickle cell anaemia highlight the difference between steady state and crisis in paediatric patients. **British Journal of Haematology**, v. 182, n. 6, p. 933–936, 2018.

CHIANG, E. Y.; FRENETTE, P. S. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 19, n. 5, p. 771–784, 2005.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI~, N. **Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction** ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. [s.l: s.n.].

CLYDE, K.; GLAUNSINGER, B. A. Chapter 1 - Getting the Message: Direct Manipulation of Host mRNA Accumulation During Gammaherpesvirus Lytic Infection. 2010.

CONNES, P. et al. The role of blood rheology in sickle cell disease. **Blood Reviews**, v. 30, n. 2, p. 111–118, 1 mar. 2016.

CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; COSTA, F. F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin**, v. 33, n. 1, p. 1–16, 2009.

DEMBIC, Z. Chapter 7 - Cytokines of the Immune System: Chemokines. **The Cytokines of the Immune System**, p. 241–262, 2015.

DEMBIC, Z.; DEMBIC, Z. **Chapter 6 – Cytokines of the Immune System: Interleukins**. [s.l: s.n.].

DIGGS, L. W. The crisis in sickle cell anemia; hematologic studies. **American journal of clinical pathology**, v. 26, n. 10, p. 1109–1118, 1956.

DIKLIĆ, M. et al. IL6 inhibition of inflammatory S100A8/9 proteins is NF-κB mediated in essential thrombocythemia. **Cell Biochemistry and Function**, v. 38, n. 4, p. 362–372, 1 jun. 2020.

DOMINGOS, I. F. et al. Influence of the βs haplotype and α-thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. **Annals of Hematology**, v. 93, n. 7, p. 1123–1129, jul. 2014.

DOS SANTOS, J. L.; CHIN, C. M. Anemia falciforme: Desafios e avanços na busca de novos fármacos. **Quimica Nova**, v. 35, n. 4, p. 783–790, 2012.

DUBERT, M. et al. Degree of anemia, indirect markers of hemolysis, and vascular complications of sickle cell disease in Africa. **Blood**, v. 130, n. 20, p. 2215–2223, 2017.

ENGLISH, D.; ANDERSEN, B. R. Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. **Journal of Immunological Methods**, v. 5, n. 3, p. 249–252, ago. 1974.

FERRONE, F. A. Sickle cell disease: Its molecular mechanism and the one drug that treats it. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1168–1173, 1 dez. 2016.

FITZGERALD ET AL. **IL-8**. [s.l.: s.n.].

GARADAH, T. S. et al. Pain frequency, severity and QT dispersion in adult patients with sickle cell anemia: Correlation with inflammatory markers. **Journal of Blood Medicine**, v. 7, p. 255–261, 2016.

GLUSHAKOVA, O. Y. et al. **The Use of Blood-Based Biomarkers to Improve the Design of Clinical Trials of Traumatic Brain Injury**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2018.

GUARDA, C. C. et al. Hydroxyurea alters circulating monocyte subsets and dampens its inflammatory potential in sickle cell anemia patients. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

HABARA, A.; STEINBERG, M. H. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 7, p. 689–696, 2016.

HAMURO, J. **IL-8**. **Biotherapy**, 2001.

HEBBEL, R. P.; VERCELLOTTI, G.; NATH, K. A. A systems biology consideration of the vasculopathy of sickle cell anemia: the need for multi-modality chemo-prophylaxis. **Cardiovascular & hematological disorders drug targets**, v. 9, n. 4, p. 271–92, 2009.

HELENA, M.; FERRAZ, C.; MURAO, M. **Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida Laboratorial diagnosis of sickle cell disease in the neonate and after the sixth month of life** *Rev. bras. hematol. hemoter.* [s.l.: s.n.].

HIGGS, D. R.; WOOD, W. G. Genetic complexity in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 33, p. 11595–11596, 2008.

HOPPE, C. et al. Simvastatin reduces vaso-occlusive pain in sickle cell anaemia: a pilot efficacy trial. **British Journal of Haematology**, v. 177, n. 4, p. 620–629, 2017.

INUSA, B. P. D. et al. Sickle cell disease—genetics, pathophysiology, clinical presentation and treatment. **International Journal of Neonatal Screening**, v. 5, n. 2, 2019.

JONES, E. B., MAERZ D. M., BUCKNER, H. J. IL-6: A cytokine at the crossroads of autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 55, p. 9–14, 2018.

JONES, H. R. et al. The role of neutrophils in inflammation resolution. **Seminars in Immunology**, v. 28, n. 2, p. 137–145, 2016.

JONES, S. A.; JENKINS, B. J. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 12, p. 773–789, 2018.

JORDAN, S. C. et al. Interleukin-6, A cytokine critical to mediation of inflammation, autoimmunity and allograft rejection: Therapeutic implications of IL-6 receptor blockade. **Transplantation**, v. 101, n. 1, p. 32–44, 2017.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B.; PROGRAM, T. D. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. v. 12, n. 1, p. 49–62, 2016.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Reviews**, v. 21, n. 1, p. 37–47, 2007.

KAUL, D. K.; FINNEGAN, E.; BARABINO, G. A. Sickle Red Cell–Endothelium Interactions. **Microcirculation**, v. 16, n. 1, p. 97–111, jan. 2009.

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

KOELMAN, L. et al. Cytokines for evaluation of chronic inflammatory status in ageing research: Reliability and phenotypic characterisation. **Immunity and Ageing**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2019.

KRUMM, B.; XIANG, Y.; DENG, J. Structural biology of the IL-1 superfamily: Key cytokines in the regulation of immune and inflammatory responses. **Protein Science**, v. 23, n. 5, p. 526–538, 2014.

LANARO, C. et al. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, n. 2, p. 235–242, 2009.

LIEW, P. X.; KUBES, P. The Neutrophil's role during health and disease. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 2, p. 1223–1248, 2019.

LIU, Y. et al. Patrolling monocytes scavenge endothelial-adherent sickle RBCs: A novel mechanism of inhibition of vaso-occlusion in SCD. **Blood**, v. 134, n. 7, p. 579–590, 2019.

MATTE, A. et al. New therapeutic options for the treatment of sickle cell disease. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2019.

MCGANN, P. T.; WARE, R. E.; CHILDREN, C. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. **Expert Opin Drug Saf**, v. 14, n. 11, p. 1749–1758, 2018.

MENEZES, A. S. O. P., LEN, C. A., HILÁRIO, M. O. E., TERRERI, M. T. R. A., BRAGA, J. A. P. Quality of life in patients with sickle cell disease. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 31, n. 1, p. 24–29, 2013.

MONCHANIN, G. et al. Plasma levels of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in athletes with sickle cell trait with or without α -thalassemia during endurance exercise and recovery. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 40, n. 2, p. 89–97, 2008.

MORRONE, K. A. et al. **Sickle Cell Disease and Hematopoietic Stem Cell Transplantation**. [s.l.: s.n.].

MUKAIDA N. & MATSUSHIMA K. Interleukin 8 and its receptor. n. October, 1998.

NARAZAKI, M.; TANAKA, T.; KISHIMOTO, T. The role and therapeutic targeting of IL-6 in rheumatoid arthritis. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 13, n. 6, p. 535–551, 2017.

ONYEKWELU, C. K. et al. Changes during vaso-occlusive crisis (VOC) and normal state in sickle cell disease patients. **Medical Case reports and Reviews**, v. 2, n. 1, p. 1–4, 2019.

PAIKARI, A.; SHEEHAN, V. A. **Fetal haemoglobin induction in sickle cell disease** **British Journal of Haematology** Blackwell Publishing Ltd, , 1 jan. 2018.

- PATHARE, A. et al. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. **American Journal of Hematology**, v. 77, n. 4, p. 323–328, dez. 2004.
- PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1561–1573, 2017.
- PIETY, N. Z. et al. Validation of a low-cost paper-based screening test for sickle cell anemia. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2016.
- PITANGA, T. N. et al. Cytokine profiles in sickle cell anemia: Pathways to be unraveled. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 04, n. 07, p. 6–12, 2013.
- PLATT, O. S. Sickle cell anemia as an inflammatory disease The finding that reperfusion injury contributes to sickle pathophysiology builds on the hypothesis that. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 3, p. 8–9, 2000.
- POLANOWSKA-GRABOWSKA, R. et al. P-selectin mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 12, p. 2392–2399, 2010.
- PULUGULLA SREE H. et al. Distinct Mechanisms Regulate IL1B Gene Transcription In Lymphoid CD4 T Cells and Monocytes. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2018.
- ROSE-JOHN, S.; WINTHROP, K.; CALABRESE, L. The role of IL-6 in host defence against infections: Immunobiology and clinical implications. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 7, p. 399–409, 2017.
- SARRAY, S. 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**, v. 72, n. 1, p. 43–47, 2015.
- SCHIMMEL, M. et al. Inflammatory and endothelial markers during vaso-occlusive crisis and acute chest syndrome in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 92, n. 11, p. E634–E636, 2017.
- SOARES, A. C. N. et al. Follow-up of children with hemoglobinopathies diagnosed by the Brazilian Neonatal Screening Program in the State of Pernambuco. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 36, n. 4, p. 250–255, 2014.
- STEINBERG, M. H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: Overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **TheScientificWorldJournal**, v. 8, p. 1295–1324, 2008.

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

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. v. 6, n. Kishimoto 1989, p. 1–16, 2014.

THEIN, M. S.; IGBINEWEKA, N. E.; THEIN, S. L. Sickle cell disease in the older adult. **Pathology**, v. 49, n. 1, p. 1–9, 2017.

THEIN, S. L. Genetic Basis and Genetic Modifiers of β -Thalassemia and Sickle Cell Disease. In: [s.l.: s.n.]. v. 1013p. 27–57.

TORRES, L. S. et al. Inflammation in sickle cell disease: Differential and down-expressed plasma levels of annexin A1 protein. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–14, 2016.

TURNER, M. D. et al. **Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease***Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*Elsevier, , 2014.

UNVER, N.; MCALLISTER, F. IL-6 family cytokines: Key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 41, n. April, p. 10–17, 2018.

UWAEZUOKE, S. N. et al. Vaso-occlusive crisis in sickle cell disease: Current paradigm on pain management. **Journal of Pain Research**, v. 11, p. 3141–3150, 2018.

WU, H.; HYMOWITZ, S. G. **Structure and function of tumor necrosis factor (tnf) at the cell surface**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. v. 1

YALE, S. H.; NAGIB, N.; GUTHRIE, T. Approach to the vaso-occlusive crisis in adults with sickle cell disease. **American Family Physician**, v. 61, n. 5, p. 1–7, 2000.

ZANETTE, D. L. et al. Differential gene expression analysis of sickle cell anemia in steady and crisis state. **Annals of Human Genetics**, v. 83, n. 5, p. 310–317, 2019.

ZHANG, D. et al. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 801–809, 2016.

ZHAO, S. et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 mediates elevated IL-6 signaling to promote chronic inflammation and multitissue damage in sickle cell disease. **FASEB Journal**, v. 32, n. 5, p. 2855–2865, 2018.

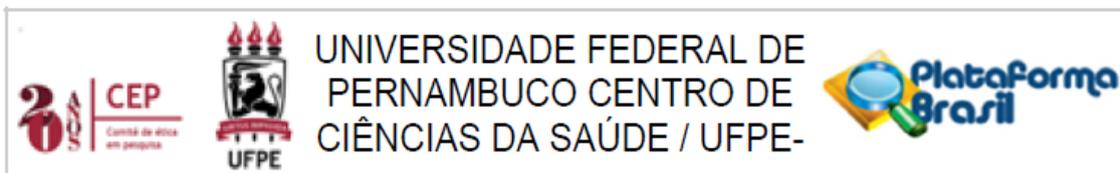
ZHONG, H.; YAZDANBAKHS, K. **Hemolysis and immune regulation** *Current Opinion in Hematology* Lippincott Williams and Wilkins, , 1 maio 2018.

ZHOU, Z.; BEHYMER, M.; GUCHHAIT, P. **Role of extracellular hemoglobin in thrombosis and vascular occlusion in patients with sickle cell anemia** *Anemia*, 2011.

ZWAHLEN, R.; WALZ, A.; ROT, A. **In Vitro and in Vivo Activity and Pathophysiology of Human Interleukin-8 and Related Peptides**. [s.l.] ACADEMIC PRESS, INC., 1993. v. 34

9. ANEXOS

9.1. ANEXO I – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização gênica e proteica de citocinas inflamatórias em pacientes com anemia falciforme durante e após crise vaso-oclusiva.

Pesquisador: Marcondes José de Vasconcelos Costa Sobreira

Área Temática: Genética Humana:

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta uma excelente delimitação do tema, com embasamento científico inquestionável e metodologia clara e objetiva. No âmbito ético, os riscos estão detalhados, no entanto, seus mecanismos para minimizá-los são pouco explorados, além de nomear o desconforto da coleta como "leve dor". Cronograma e Orçamento estão descritos no projeto e coerentes.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 06 de Dezembro de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

9.2. ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO MAIORES DE 18 ANOS (resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa "Caracterização gênica e proteica de citocinas inflamatórias em pacientes com anemia falciforme durante e após crise vaso-oclusiva", que está sob a responsabilidade do pesquisador Marcondes José de Vasconcelos Costa Sobreira (Endereço: Rua Capitão Jacinto da Cruz, 65, Areias, Recife, PE, CEP: 50870-030 – Fone: (81) 99540-7831 –E-mail: marcondesj93@hotmail.com) e sob a orientação do professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra ((81) 99800-8105 - macbezerraufpe@gmail.com). Participa também desta pesquisa: Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo ((81) 99908-9382 – araujoarl@hotmail.com).

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. O (a) Sr. (a) tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

A anemia falciforme é uma doença que altera a forma das hemácias e pode provocar, dentre as várias complicações clínicas, crises vaso-oclusivas (crises dolorosas), comprometendo a qualidade de vida dos portadores. Esta pesquisa pretende avaliar se o desenvolvimento das crises vaso-oclusivas está relacionado a fatores imunogenéticos. Nós acreditamos que variações de proteínas inflamatórias possam estar relacionadas aos processos de dor. As amostras de sangue serão coletadas entre dezembro de 2017 e fevereiro de 2019, no momento do internamento do paciente no Hospital do HEMOPE e três meses após alta médica, durante visitas de rotina ao Ambulatório do HEMOPE. Dessa forma, gostaríamos que você doasse 5 ml de sangue periférico, obtidos usando agulhas e seringas descartáveis. O risco para o paciente é a ocorrência de uma dor leve resultante da picada da agulha. Além disso, a área da coleta pode ficar roxa, o que pode ser amenizado colocando compressas de gelo nas primeiras horas após a coleta, em seguida, podem ser colocadas compressas mornas. Também gostaríamos que o (a) senhor (a) permitisse o acesso aos dados do seu prontuário. Como benefícios ao paciente, acreditamos que a identificação de marcadores para as crises vaso-oclusivas possibilitará métodos de prevenção mais eficazes para o evento, promovendo o aumento da qualidade de vida dos pacientes.

As informações desta pesquisa serão confidenciais, sendo divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos

voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo garantido o sigilo sobre a sua participação. Todos os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em computador pessoal sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

**Caracterização gênica e proteica de citocinas inflamatórias em
pacientes com anemia falciforme durante e após crise vaso-oclusiva**

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo "Caracterização gênica e proteica de citocinas inflamatórias em pacientes com anemia falciforme durante e após crise vaso-oclusiva", como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data

Assinatura do participante

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar.

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

10. Currículo Lattes Atualizado

Marcondes José de Vasconcelos Costa Sobreira
Curriculum Vitae

Marcondes José de Vasconcelos Costa Sobreira

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Marcondes José de Vasconcelos Costa Sobreira
Filiação Marcondes Costa Sobreira e Tatiana Maria Vilela de Vasconcelos Sobreira
Nascimento 28/10/1993 - Recife/PE - Brasil
Carteira de Identidade 5801426 SDS – PE – 26/07/2018
CPF 146.167.897-89

Endereço eletrônico marcondesj93@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2017** Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Caracterização gênica e proteica de citocinas inflamatórias em pacientes com anemia falciforme durante e após crise vaso-oclusiva
Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra
Co-orientador: Antonio Roberto Lucena de Araújo
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2013 - 2017** Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO IVS-14-1046 C>T NO GENE ANXA2 COM O DESENVOLVIMENTO DE DOPPLER TRANSCRANIANO DE ALTO RISCO EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME
Orientador: Rayssa Leal Borges de Medeiros
- 2015 - 2016** Graduação em Biomedical Science.
National University of Ireland Galway, NUI Galway, Galway, Irlanda
com período sanduíche em National University of Ireland Galway
(Orientador: Dr. Helen Dodson)
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2009 - 2010** Ensino Médio (2o grau) .
Colégio Nossa Senhora das Dores (Nova Friburgo - RJ), CNSD, Brasil, Ano de obtenção: 2010
-

Formação complementar

- 2019 - 2019** Curso de curta duração em IV Curso de Imersão em Líquidos Biológicos.
(Carga horária: 20h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2017 - 2017** Curso de curta duração em V Curso de Interpretação do Hemograma. (Carga horária: 45h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

- 2014 - 2014** Curso de curta duração em PCR em tempo real como ferramenta para o diagnóstico molecular. (Carga horária: 8h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Biologia do Câncer: Princípios Moleculares, Celulares e Teciduais. (Carga horária: 30h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Projetos

Projetos de pesquisa

- 2017 - Atual** Caracterização gênica e proteica de citocinas inflamatórias em pacientes com anemia falciforme durante e após crise vaso-oclusiva
Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (4); Doutorado (2);
Integrantes: Marcondes José de Vasconcelos Costa Sobreira (Responsável); ; Antonio Roberto Lucena Araujo; Marcos Andre Cavalcanti Bezerra
- 2016 - 2016** Analysis of H2AX abundance in human mesenchymal stem-cells
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (4); Mestrado profissionalizante (2); Doutorado (6);
Integrantes: Marcondes José de Vasconcelos Costa Sobreira (Responsável); ; Helen Dodson
- 2014 - 2015** Viabilidade, Expansão e Caracterização das Células-Tronco da Geléia de Wharton do Cordão Umbilical Humano, Criopreservadas com Meio Enriquecido com Emulsão de Vitamina E
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (4); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (4);
Integrantes: Marcondes José de Vasconcelos Costa Sobreira (Responsável); ; Marcia Bezerra da Silva

Idiomas

- Inglês** Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem
- Espanhol** Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem
- Italiano** Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Razoavelmente
- Português** Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. BATISTA, THAIS HELENA CHAVES; **SOBREIRA, MARCONDES JOSÉ DE VASCONCELOS COSTA**; SANTANA, RODRIGO MARCIONILO DE; ARCANJO, GABRIELA DA SILVA; RAMOS, CAMILA MABEL DE ALBUQUERQUE; ALBUQUERQUE, DULCINÉIA MARTINS; ARAUJO, ADERSON DA SILVA; ANJOS, ANA CLÁUDIA MENDEONÇA DOS; COSTA, FERNANDO FERREIRA; LUCENA-ARAUJO, ANTONIO ROBERTO; BEZERRA, MARCOS ANDRÉ CAVALCANTI

Interaction between hemoglobin S and N-Baltimore: a case report in Pernambuco, Brazil. Hematology, Transfusion and Cell Therapy., v.41, p.1 - 4, 2019.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SOUZA, M. B. S.; MARTINS, D. A. P.; SANTANA, R. M.; Sobreira, M. J. V. C.; RAMOS, C. M. A.; XAVIER, A. L.; ARCANJO, G. S.; ARAUJO, A. S.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C.

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE BMP6 COM O DESENVOLVIMENTO DE OSTEONECROSE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2017, 2017, Curitiba.

REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA. , 2017.

2. SOUZA, M. B. S.; MARTINS, D. A. P.; Sobreira, M. J. V. C.; BATISTA, T. H. C.; RAMOS, C. M. A.; XAVIER, A. L.; OLIVEIRA, J. M. F.; ARAUJO, A. S.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C.

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE VDR NA SUSCEPTIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO DE OSTEONECROSE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2017, 2017, Curitiba.

REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA. , 2017.

3. SILVA, E. N.; ARCANJO, G. S.; XAVIER, A. L.; RAMOS, C. M. A.; Sobreira, M. J. V. C.; BATISTA, J. V. G. F.; BATISTA, T. H. C.; ARAUJO, A. S.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C.

CARACTERIZAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO CLUSTER BETA DE PACIENTES COM HEMOGLOBINOPATIA SC DE PERNAMBUCO In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2017, 2017, Curitiba.

REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA. , 2017.

4. BATISTA, T. H. C.; SANTANA, R. M.; ARCANJO, G. S.; RAMOS, C. M. A.; Sobreira, M. J. V. C.; XAVIER, A. L.; MENEZES, A. G.; ANJOS, A. C.; LUCENA-ARAUJO, A. R.; BEZERRA, M. A. C.

INTERAÇÃO ENTRE AS HEMOGLOBINAS S E N-BALTIMORE: UM RELATO DE CASO In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2017, 2017, Curitiba.

REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA. , 2017.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **Sobreira, M. J. V. C.**

Hemoglobalizando: a visão além dos vasos, 2018. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2017**, 2017. (Congresso)
AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE VDR NA SUSCEPTIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO DE OSTEONECROSE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.
2. **II Simpósio Nacional de Hematologia Oncologia D'Or**, 2017. (Simpósio)

Organização de evento

1. **Sobreira, M. J. V. C.**
VIII Jornada de Pós-Graduação em Genética, 2018. (Congresso, Organização de evento)