



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR

MADI VEIGA DINIZ

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO INFLAMASSOMA *NLRP3*
E DE CITOCINAS DA INFLAMAÇÃO EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA
FALCIFORME E ÚLCERAS DE MEMBRO INFERIOR**

Recife

2025

MADI VEIGA DINIZ

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO INFLAMASSOMA *NLRP3*
E DE CITOCINAS DA INFLAMAÇÃO EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA
FALCIFORME E ÚLCERAS DE MEMBRO INFERIOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Prof. Antônio Roberto Lucena de Araujo

Coorientador: Prof. Igor Farias Domingos

Recife
2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Diniz, Madi Veiga.

Avaliação da expressão gênica do inflamassoma NLRP3 e de citocinas da inflamação em indivíduos com anemia falciforme e úlceras de membro inferior / Madi Veiga Diniz. - Recife, 2025. 117f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, 2025.

Orientação: Marcos André Cavalcanti Bezerra.

Coorientador: Antônio Roberto Lucena de Araujo.

Coorientador: Igor Farias Domingos.

Inclui referências e anexos.

1. Doença Falciforme; 2. Feridas Cutâneas; 3. Hidroxiureia; 4. Interleucinas; 5. Inflamassoma NLRP3. I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti. II. Araújo, Antônio Roberto Lucena de. III. Domingos, Igor Farias. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

MADI VEIGA DINIZ

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO INFLAMASSOMA *NLRP3*
E DE CITOCINAS DA INFLAMAÇÃO EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA
FALCIFORME E ÚLCERAS DE MEMBRO INFERIOR**

**Área de Concentração:
Genética Molecular e Evolução**

Aprovado em / /

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Jaqueline de Azevêdo Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Manuela Freire Hazin Costa
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Magnun Nuelo Nunes dos Santos
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Edis Belini Júnior
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Recife
2025

Dedico esse trabalho aos pacientes que participaram da pesquisa e agradeço a confiança depositada e contribuição imensurável à ciência. Esse estudo é, acima de tudo, uma homenagem à força de cada um de vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder força, sabedoria e perseverança durante esse longo processo. Sem a Sua orientação, nada seria possível.

À minha mãe Maria, um exemplo de educadora, meu pai Mário, minha tia-mãe, Dute, meus irmãos Dió, Méri, Aninha e Pedro e meus sobrinhos pelo amor incondicional, apoio constante, torcida e compreensão nos momentos de ausência. Agradeço profundamente ao meu esposo Wellington e aos meus filhos Gabriel e Júlia pelo apoio e incentivo durante toda a trajetória do doutorado. O carinho, a paciência e a presença de vocês foram fundamentais para que eu pudesse superar os desafios e realizar esse sonho. Amo vocês.

À UFPE pela oportunidade de realizar minha formação acadêmica e científica no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Ao meu orientador Marcos e coorientadores Igor e Antônio, registro minha profunda admiração e gratidão pelo acolhimento, orientação dedicada e constante, pelos ensinamentos valiosos e pela confiança depositada no meu trabalho. Marcos, sua presença atenta e incentivo contribuíram de maneira decisiva para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Agradeço às instituições de fomento INCT (Processo: 405918/2022-4), CNPq (Processo: 408710/2021-7), NHCL e FACEPE (APQ-1212-2.02/22) cujo apoio financeiro foi fundamental para a execução do projeto.

Aos meus professores da Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular cujos ensinamentos e orientações foram fundamentais para a minha trajetória acadêmica e para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos membros da banca agradeço por compartilharem seu tempo, conhecimento e generosidade. Reconheço e admiro o compromisso de todos com a formação de novos pesquisadores e com o avanço da ciência. Levo comigo cada ensinamento recebido durante este processo.

Aos amigos e colegas de trabalho do Hospital das Clínicas e do Hospital Agamenon Magalhães, pela torcida e incentivo nos momentos mais desafiadores. Em especial, a Lequinho e Gabizinha pelo apoio, amizade e palavras de encorajamento que recebi de vocês foram verdadeiros pilares, trazendo força e esperança quando mais precisei. Cada gesto, cada conversa, dúvidas “infantis”

(kkk) e muitas gargalhadas, até nos momentos de tensão; cada demonstração de carinho fizeram toda a diferença para que eu pudesse seguir em frente e realizar este sonho. Obrigada por acreditarem em mim e por celebrarem comigo cada vitória. Este doutorado também é de vocês!

Aos excelentes profissionais Thaís, Bárbara, João, Heloísa, Ryan, Steffany e seus coordenadores que carinhosamente chamo de “anjos” na minha trajetória acadêmica, pois o caminho não é trilhado sozinho. O apoio de vocês me deixou mais confiante em seguir em frente.

Aos funcionários da Fundação HEMOPE Dr. Aderson Silva e Dra. Ana Cláudia dos Anjos e, em especial, aos “guardiões” da coleta, cuja dedicação e profissionalismo foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa. O apoio prestado, a colaboração constante e o cuidado com os pacientes foram essenciais para a realização deste trabalho.

Agradeço a contribuição no ensino e apoio de cada funcionário do LABCEN, principalmente a Gabi, Carol, Aleide e Neyla, e compromisso inestimável com a ciência. Muito obrigado a todos pela confiança e parceria.

Renovo meus agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, reiterando minha estima e respeito por cada colaboração recebida.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

– Albert Einstein

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma doença hereditária caracterizada por inflamação crônica e diversas complicações clínicas, entre as quais se destacam as úlceras de perna ou maleolares (UMs). Estudos recentes têm evidenciado o papel central das citocinas pró-inflamatórias e dos genes do inflamassoma *NLRP3* na fisiopatologia dessas lesões. Neste estudo, foram avaliados 96 adultos, divididos em quatro grupos: 23 com AF e UMs abertas (UMA), 22 com AF e UMs fechadas (UMF), 31 controles HbSS sem UMs e 20 controles HbAA. Os resultados mostraram que os níveis de hemoglobina fetal (HbF) ($p = 0,004$) e hemoglobina total ($p = 0,014$) foram significativamente menores no grupo UMA, sugerindo maior gravidade clínica nesse subgrupo. A dosagem das citocinas séricas revelou níveis elevados de TNF- α e IL-12p70 em pacientes com UM, inclusive naqueles sob tratamento com hidroxiureia (HU), indicando inflamação persistente apesar da terapia convencional. A análise discriminante (PLS-DA) demonstrou separação parcial dos grupos com base nos níveis de citocinas, e os escores de importância variável (VIP) destacaram TNF- α e IL-8 como citocinas essenciais para distinguir entre os grupos clínicos. Observou-se ainda forte correlação entre citocinas inflamatórias e marcadores hemolíticos, sugerindo uma inter-relação entre hemólise, inflamação e dano tecidual. No que se refere à expressão gênica, *CASP1* estava mais expresso no grupo UMF em comparação aos controles HbAA ($p = 0,001$), enquanto *NLRP3* mostrou expressão aumentada tanto nos grupos UMF ($p < 0,001$) quanto UMA ($p = 0,001$). Por outro lado, *IL18* estava menos expresso nos grupos UMA ($p = 0,002$) e UMF ($p = 0,004$) em relação ao grupo Controle-HbSS, independentemente do uso de HU, sugerindo que a hidroxiureia não modula a transcrição desse gene nesse contexto. Esses achados indicam que a diminuição da expressão de *IL18* pode estar associada à cronicidade das úlceras de perna na AF, independentemente do estágio da doença ou da terapia utilizada. Em conjunto, nossos achados reforçam que as úlceras de perna na AF resultam de uma interação multifatorial entre inflamação crônica, hemólise e comprometimento da cicatrização de feridas. Níveis elevados de citocinas, especialmente TNF- α , em pacientes com úlceras ativas e cicatrizadas destacam o ambiente inflamatório persistente associado a essa complicação, mesmo após a resolução clínica. Além disso, sugerem uma desregulação da sinalização mediada por *IL-18* no ambiente inflamatório crônico das UMs, ressaltando a importância de abordagens terapêuticas complementares, como terapias anti-inflamatórias, e sugerindo que TNF- α , IL-8, *CASP1*, *NLRP3* e *IL-18* podem ser potenciais biomarcadores e alvos para o manejo futuro dessas complicações na AF. Pesquisas futuras devem se concentrar nos mecanismos de inflamação crônica e nas vias do inflamassoma para desenvolver tratamentos personalizados e eficazes para pacientes com AF e UMs.

Palavras-chave: Doença Falciforme; Feridas Cutâneas; Hidroxiureia; Interleucinas; Inflamassoma *NLRP3*.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a hereditary disease characterized by chronic inflammation and multiple clinical complications, among which leg ulcers (LUs) stand out. Recent studies have highlighted the central role of pro-inflammatory cytokines and *NLRP3* inflammasome genes in the pathophysiology of these lesions. In this study, 96 adults were evaluated and divided into four groups: 23 with SCA and active leg ulcers (ALU), 22 with SCA and healed leg ulcers (HLU), 31 HbSS controls without ulcers, and 20 HbAA controls. The results showed that fetal hemoglobin (HbF) ($p = 0.004$) and total hemoglobin ($p = 0.014$) levels were significantly lower in the ALU group, suggesting greater clinical severity in this subgroup. Serum cytokine measures revealed elevated TNF- α and IL-12p70 levels in patients with leg ulcers, including those under hydroxyurea (HU) treatment, indicating persistent inflammation despite conventional therapy. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) demonstrated partial separation of the groups based on cytokine levels, and the variable importance in projection (VIP) scores identified TNF- α and IL-8 as key cytokines distinguishing the clinical groups. A strong correlation was also observed between inflammatory cytokines and hemolytic markers, suggesting an interrelationship among hemolysis, inflammation, and tissue damage. Regarding gene expression, CASP1 was upregulated in the HLU group compared with HbAA controls ($p = 0.001$), whereas NLRP3 expression was increased in both the HLU ($p < 0.001$) and ALU ($p = 0.001$) groups. Conversely, IL18 expression was reduced in both ALU ($p = 0.002$) and HLU ($p = 0.004$) groups compared with the HbSS control group, regardless of HU use, suggesting that hydroxyurea does not modulate IL18 transcription in this context. These findings indicate that decreased IL18 expression may be associated with the chronicity of leg ulcers in SCA, independent of disease stage or therapy. Collectively, our results reinforce that leg ulcers in SCA arise from a multifactorial interaction involving chronic inflammation, hemolysis, and impaired wound healing. Elevated cytokine levels, particularly TNF- α , in patients with both active and healed ulcers highlight the persistent inflammatory milieu associated with this complication, even after clinical resolution. Moreover, they suggest a dysregulation of IL-18-mediated signaling within the chronic inflammatory environment of LUs, underscoring the importance of complementary therapeutic approaches, such as anti-inflammatory strategies. Finally, TNF- α , IL-8, CASP1, NLRP3, and IL-18 emerge as potential biomarkers and therapeutic targets for future management of leg ulcers in SCA. Future research should focus on chronic inflammation mechanisms and inflammasome pathways to develop personalized and effective treatments for patients with SCA and leg ulcers.

Keywords: Sickle Cell Disease; Skin Wounds; Hydroxyurea; Interleukins; NLRP3 Inflammasome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

| | |
|--|----|
| Figura 1: Localização e organização dos genes do tipo beta globina (família de genes do tipo beta – localização p15.5..... | 23 |
| Figura 2: Alterações genéticas no gene da beta globina (HBB)..... | 24 |
| Figura 3: Incidência de nascimentos de indivíduos com anemia falciforme por 100.000 nascidos vivos por país no ano de 2021..... | 25 |
| Figura 4: Estimativa de casos de doença falciforme (DF) e traço falciforme (AS) por nascidos vivos e óbitos por DF relatados no Brasil no ano de 2021..... | 27 |
| Figura 5: A fisiopatologia da doença falciforme..... | 29 |
| Figura 6: Fisiopatologia molecular da doença falciforme..... | 32 |
| Figura 7: Complicações clínicas comuns da anemia falciforme..... | 35 |
| Figura 8: Imagens de úlceras maleolares em paciente com Anemia Falciforme, em tratamento..... | 38 |
| Figura 9: Componentes do inflamassoma: esquema geral..... | 43 |
| Figura 10: Componentes estruturais dos inflamassomas..... | 44 |
| Figura 11: Priming e ativação do inflamassoma NLRP3..... | 48 |
| Figura 12: Mecanismos fisiopatológicos da AF induzidos pelo heme e inflamassoma. | 51 |

CAPÍTULO 1 – INFLAMMATORY CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH SICKLE CELL ANAEMIA AND LEG ULCERS

| | |
|--|----|
| Figure 1 Cytokine levels in patients with active leg ulcers (ALU), healed leg ulcers (HLU) and controls with sickle cell anaemia (ControlsHbSS)..... | 55 |
| Figure 2 Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), variable importance in | |

| | |
|--|----|
| projection (VIP) scores and Spearman correlation analysis of cytokine profiles..... | 56 |
| Fig. S1: Cytokine levels in patients with leg ulcers (LU) compared to control groups... | 63 |
| Fig. S2: Effect of hydroxyurea (HU) therapy on cytokine profiles in patients with leg ulcers (LU)..... | 64 |

CAPÍTULO 2 – LEG ULCERS IN SICKLE CELL ANEMIA ARE ASSOCIATED WITH REDUCED *IL18* EXPRESSION AND INFLAMMASOME IMBALANCE

| | |
|--|----|
| Figure 1. Relative expression of inflammasome-related genes in patients with sickle cell anemia (SCA) according to the clinical status of leg ulcers..... | 81 |
| Supplementary Figure 1: Relative expression of inflammasome-related genes in patients with sickle cell anemia (SCA) and leg ulcers compared to individuals with normal hemoglobin profile..... | 83 |
| Supplementary Figure 2: Relative expression of inflammasome-related genes in patients with sickle cell anemia (SCA) according to the clinical status of leg ulcers.... | 83 |
| Supplementary Figure 3: Relative expression of inflammasome-related genes in patients with sickle cell anemia (SCA) and leg ulcers under hydroxyurea therapy and controls..... | 84 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – INFLAMMATORY CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH SICKLE CELL ANAEMIA AND LEG ULCERS

| | |
|---|----|
| Table S1. Baseline clinical and laboratory features of SCA patients according to the LU status..... | 65 |
|---|----|

CAPÍTULO 2 – LEG ULCERS IN SICKLE CELL ANEMIA ARE ASSOCIATED WITH REDUCED *IL18* EXPRESSION AND INFLAMMASOME IMBALANCE

| | |
|--|----|
| Table 1. Baseline clinical and laboratory features of SCA patients according to the LU status..... | 82 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| Item | Definição |
|------------------|--|
| A | Adenina |
| α | Alfa |
| $\alpha^{3,7kb}$ | Deleção $\alpha^{3,7kb}$ |
| AF | Anemia Falciforme |
| ARB | Árabe-Indiano |
| ASC | Proteína adaptadora do tipo <i>speck</i> associada à apoptose contendo um domínio CARD |
| AVC | Acidente Vascular Cerebral |
| BEN | Benin |
| β | Beta |
| 2,3-DPG | 2,3 difosfoglicerato |
| β^s | Cadeia globínica beta com alteração para a formação da HbS |
| BI | Bilirrubina indireta |
| BT | Bilirrubina total |
| BTK | Tirosina quinase de Bruton |
| CAPS | Síndrome periódica associada à criopirina |
| CAR | República Central Africana |
| CARD | Domínio de recrutamento de caspase |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| Ct | Ciclo de threshold |
| CLRs | Receptores de lectina tipo C |
| CVO | Crise vaso-oclusiva |

| | |
|-----------------|--|
| DAMPs | do inglês, <i>damage-associated molecular patterns</i> |
| DF | Doença falciforme |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> |
| dNTP | <i>Nucleoside triphosphate</i> |
| eDAMPs | do inglês, <i>erythrocyte damage-associated molecular patterns</i> |
| EDTA | <i>Ethylenediamine tetracetic acid</i> |
| ET-1 | Endotelina-1 |
| FvW | Fator de von Willebrand |
| FC | Fold Change |
| G | Guanina |
| Glu | Ácido Glutâmico |
| GSDMD | Gasdermina D |
| GWAS | do inglês, <i>Genome-Wide Association Study</i> |
| Hb | hemoglobina |
| Hb A | Hemoglobina A |
| Hb AS | Indivíduo traço falciforme |
| <i>HBB</i> | Gene da Hemoglobina Subunidade Beta |
| Hb F | Hemoglobina Fetal |
| Hb S | Hemoglobina S |
| Hb S/ β^0 | S/ β^0 talassemia |
| HEMOPE | Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco |
| HMGB1 | do inglês, <i>high mobility group box 1 protein</i> |
| HU | Hidroxiureia |
| ICAM-1 | Molécula de adesão intercelular 1 |
| IL | Interleucina |

| | |
|----------------|---|
| kDa | Kilodalton |
| Labcen | Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco |
| LDH | Lactato desidrogenase |
| MD-2 | Fator de diferenciação mieloide-2 |
| miRNAs | microRNAs |
| μL | Microlitro |
| mL | Mililitro (s) |
| mRNA | RNA mensageiro |
| NETs | do inglês <i>neutrophil extracellular traps</i> |
| NEK7 | Quinase relacionada ao NIMA 7 |
| NF-κB | Fator de transcrição nuclear |
| kappa B ng | Nanograma |
| NO | Óxido Nítrico |
| NOD | Receptores do tipo NOD |
| NOS | Óxido nítrico sintase |
| O ₂ | Oxigênio |
| OS | Fosfatidilserina |
| <i>p</i> | <i>p-value</i> |
| PBMC | Células mononucleares do sangue |
| periférico PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| PRRs | do inglês, <i>pattern recognition receptors</i> |
| PYD | Domínio de pirina |
| qPCR | PCR em tempo real (PCR quantitativa) |

| | |
|--------------|---|
| RLRs | Receptores semelhantes a RIG-I |
| RMN | Ressonância magnética nuclear |
| RPM | Rotações por minuto |
| RNA | <i>Ribonucleic Acid</i> |
| RNA Pol | RNA Polimerase |
| ROS | Radicais livres de oxigênio |
| RT- qPCR | <i>Quantitative reverse transcription PCR</i> |
| SEA | Sequestro esplênico agudo |
| SEN | Senegal |
| SER | Sistema retículo endotelial |
| SNP | Polimorfismo de nucleotídeo único |
| STA | Síndrome Torácica Aguda |
| T | Timina |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| TGF- β | <i>Transforming Growth Factor Beta</i> |
| TLRs | Receptores do tipo Toll |
| UFPE | Universidade Federal de Pernambuco |
| UM | Úlcera Maleolar |
| UMA | Úlcera Maleolar Aberta |
| UMF | Úlcera Maleolar Fechada |
| UTR | <i>Untranslated region</i> |
| Val | Valina |
| VCAM-1 | Molécula de adesão celular vascular 1 |
| VCM | Volume corpuscular médio |
| WBC | do inglês, <i>White blood cells</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 | OBJETIVOS | 21 |
| 1.1.1 | Objetivo geral | 21 |
| 1.1.2 | Objetivos específicos | 21 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA | 22 |
| 2.1 | HISTÓRICO E ETIOLOGIA | 22 |
| 2.2 | EPIDEMIOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME | 24 |
| 2.3 | FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME | 27 |
| 2.4 | HEMÓLISE, DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E INFLAMAÇÃO ESTÉRIL NA ANEMIA FALCIFORME | 29 |
| 2.5 | MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA ANEMIA FALCIFORME | 33 |
| 2.5.1 | Úlceras maleolares na Anemia Falciforme | 35 |
| 2.5.2 | Fisiopatologia das Úlceras Maleolares na Anemia Falciforme | 36 |
| 2.5.3 | Sintomas clínicos das Úlceras Maleolares na Anemia Falciforme | 37 |
| 2.5.4 | Tratamento das Úlceras Maleolares na Anemia Falciforme | 38 |
| 2.6 | MODULADORES GENÉTICOS DA ANEMIA FALCIFORME | 39 |
| 2.7 | INFLAMASSOMAS | 42 |
| 2.7.1 | Inflamassoma NLRP3 | 46 |
| 2.8 | PAPEL DO NLRP3 NA ANEMIA FALCIFORME | 49 |
| 2.9 | CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ÓXIDO NÍTRICO (NO) NAS ÚLCERAS MALEOLARES E ANEMIA FALCIFORME | 51 |
| 3 | CAPÍTULO 1: INFLAMMATORY CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA AND LEG ULCERS | 53 |
| 4 | CAPÍTULO 2: LEG ULCERS IN SICKLE CELL ANEMIA ARE ASSOCIATED WITH REDUCED <i>IL-18</i> EXPRESSION AND INFLAMMASOME IMBALANCE | 67 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS | 85 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 87 |
| | CURRÍCULO LATTES DURANTE O VÍNCULO COM O PPGGBM | 91 |
| | ANEXO A: PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP | 99 |

| | |
|--|------------|
| ANEXO B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE | 100 |
| ANEXO C: REGRAS DE SUBMISSÃO DO PERIÓDICO | 103 |

1 INTRODUÇÃO

Anemia Falciforme (AF) é a doença hereditária grave mais comum no mundo cuja mutação do alelo β^S surgiu há mais de 7.000 anos no continente africano. Estima-se que, entre os anos de 2000 e 2021, o número de nascimentos, no mundo, atingiu cerca de 515.000 crianças com AF, sendo a maioria dos casos ocorrendo na África Subsaariana. Nesse período, as estimativas de pessoas com a doença aumentaram de 5,46 milhões para 7,74 milhões. No Brasil, os valores alcançam 60.000 a 100.000 pacientes com DF em todo o país. O número absoluto de casos diagnosticados em 2022 no Brasil apresenta os estados da Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Maranhão e Rio de Janeiro com níveis mais elevados da doença falciforme. No estado de Pernambuco, a incidência de DF, no ano de 2021, foi de 1:3.236 nascidos vivos, de 1:51 nascidos vivos com traço falciforme e 15 óbitos atribuídos à DF.

A AF é uma doença monogênica e possui caráter autossômico recessivo. A alteração molecular da AF é causada por uma substituição da base nitrogenada adenina por timina no sexto códon do gene que codifica a cadeia β -globina (*HBB*), localizado no *locus* 11p15.15. Em consequência dessa mutação, ocorre a troca do aminoácido ácido glutâmico pela valina e formação de uma hemoglobina variante, a hemoglobina S (HbS), ao invés da síntese de tetrâmeros de hemoglobina normal (Hb A). Tal alteração molecular faz com que, na ausência do oxigênio, a hemoglobina S polimerize no interior das hemácias.

Em consequência da polimerização da HbS, as hemácias sofrem mudanças conformacionais e assumem a aparência de foice, o que dificulta a passagem pelos vasos sanguíneos favorecendo o processo de vaso-oclusão. Além da polimerização da HbS, a fisiopatologia da AF envolve a biorreologia prejudicada das hemácias, disfunção endotelial e inflamação estéril. Esses processos resultam em dor aguda e crônica, lesão e falência dos órgãos-alvo. A variabilidade clínica e os danos progressivos a múltiplos órgãos são características constantes da AF, embora as causas exatas ainda não sejam totalmente compreendidas.

As úlceras maleolares (UM) ou úlceras de perna são consideradas as manifestações cutâneas mais frequentes na AF e aparecem a partir da segunda década de vida. No Brasil, a prevalência das UMs atinge 20% das pessoas com AF. Apesar da etiologia das UMs não ser bem elucidada, sabe-se que sua prevalência e

incidência podem variar de acordo com a distribuição geográfica, fatores ambientais, faixa etária, genótipos da AF, moduladores genéticos e evolução da doença.

Pesquisas recentes mostraram que pacientes com anemia falciforme (AF) e úlceras maleolares (UMs) apresentam níveis elevados da citocina pró-inflamatória IL-8, destacando a importância da inflamação nessas lesões e sugerindo que a IL-8 pode ser um indicador de mau prognóstico. Outro estudo investigou a frequência das UMs e sua relação com níveis reduzidos de hemoglobina fetal (HbF) e hemoglobina total (Hb) na AF. A ocorrência das UMs na AF também pode ser influenciada por moduladores genéticos. Além disso, a isquemia, o dano tecidual e a inflamação criam um ambiente propício para a formação de úlceras.

Ademais, estudos evidenciam que as células falcizadas induzem a inflamação através de DAMPs (Padrão Molecular Associado ao Dano) como o grupo heme, HMGB1 (do inglês, *High-mobility group box 1*) ou ácido úrico. No contexto da AF, o complexo inflamassoma e as citocinas IL-1 β e IL-18 se destacam como possíveis marcadores de prognóstico devido à sua relevância na heterogeneidade clínica da doença. O inflamassoma é uma plataforma proteica intracelular que desempenha um papel vital na clivagem e consequente liberação de formas ativas de citocinas pró-inflamatórias que agem em resposta a PAMPs ou DAMPs. Diversos inflamassomas têm sido descritos, principalmente o NLRP3, devido ao seu papel importante contra patógenos e na inflamação.

Diante da complexidade das úlceras maleolares (UMs) na anemia falciforme, compreender profundamente suas causas é fundamental para avançar no manejo clínico dessa complicação. Investigar os mecanismos que levam ao surgimento e à persistência das UMs não só amplia o entendimento da fisiopatologia, mas também abre caminho para a identificação de marcadores preditivos capazes de antecipar o risco e a gravidade dessas lesões.

Nesse contexto, investigar essas vias moleculares pode revolucionar o cuidado aos pacientes, promovendo intervenções mais precoces e personalizadas, com potencial para melhorar significativamente a qualidade de vida de quem convive com anemia falciforme.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis das citocinas da inflamação IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-18 e TNF α e o perfil de expressão dos genes *NLRP3*, *CASP-1*, *IL-1 β* e *IL-18* em pacientes com anemia falciforme com e sem úlceras maleolares.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Quantificar os níveis séricos das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-18 e TNF α em pacientes com anemia falciforme com e sem úlcera de perna;
2. Analisar a expressão dos genes (*NLRP3*, *CASP1*, *IL-1 β* e *IL-18*) em leucócitos de pacientes com anemia falciforme com e sem úlcera de perna;
3. Verificar a associação dos níveis séricos das citocinas inflamatórias e a expressão dos genes supracitados com a ocorrência de úlcera de perna em pacientes com anemia falciforme.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO E ETIOLOGIA

Em 1910, em análise de sangue periférico de um jovem estudante de odontologia de ascendência africana, a presença de hemácias alongadas chamou a atenção do médico americano James Herrick. O paciente apresentava anemia crônica e grave, fortes dores nas articulações, tendência a úlceras de perna e icterícia hemolítica. Esse cenário marcou a primeira descrição da doença que, mais tarde, ficou conhecida como anemia falciforme (Herrick 2001).

Em 1917, Emmel observou a mudança na forma original da hemácia, bicôncava, para um aspecto de foice, *in vitro*, e em 1922, o termo anemia falciforme foi utilizado por Manson (Naoum 1997; Claudino et al. 2003). Nesse período, vários casos foram relatados com características semelhantes que serviram para o entendimento a respeito da etiologia da doença (Serjeant 2010).

Em 1927, Hahn e Gillespie publicaram um estudo importante sobre a anemia falciforme (AF), no qual eles observaram que, os pacientes com AF sofriam episódios dolorosos recorrentes devido à oclusão vascular desencadeando danos crônicos aos órgãos (Washburn and Myer 1910; Hahn and Gillespie 1927).

O estudante de medicina brasileiro Jessé Santiago Accioly Lins desenvolveu, em 1947, hipóteses sobre a hereditariedade dessa doença ao observar famílias afrodescendentes. Dessa forma, identificou os mecanismos de herança genética da AF como uma doença de caráter autossômico recessivo, obtendo reconhecimento internacional apenas no ano de 1973 (Accioly 1947).

Após dois anos, em 1949, Linus Pauling e colaboradores demonstraram que havia uma diferente migração eletroforética da hemoglobina de pacientes com anemia falciforme quando comparada com a hemoglobina de indivíduos normais (Naoum P.C. 1997). Em seguida, verificaram a natureza molecular da doença, descrevendo a hemoglobina S (HbS) como a variante anormal da hemoglobina normal (HbA) (Pauling et al. 1949). Ainda em 1949, através dos trabalhos de Neel e Beet, se definiu a doença somente em estado de homozigose, sendo os heterozigotos portadores assintomáticos (Claudino et al. 2003).

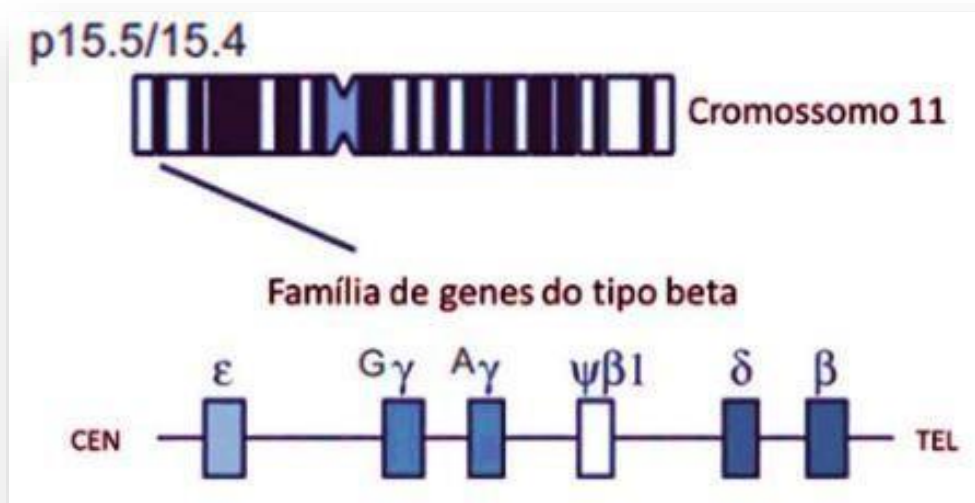
Vernon Ingram e J.A. Hunt avançaram com as pesquisas e, em 1956, determinaram que a mutação específica que causa a anemia falciforme envolve a

substituição de um único aminoácido na hemoglobina (ácido glutâmico por valina na posição 6 da cadeia β -globina). Portanto, os pesquisadores ampliaram a compreensão da patologia e, assim, puderam esclarecer os conceitos moleculares e genéticos (Ingram 1956).

Nas décadas de 60 e 70, os estudos permitiram descrever a fisiopatologia da doença, incluindo a vaso-oclusão, que causa dor intensa e complicações graves, como danos aos órgãos (Serjeant 1974; Kato 2007; Serjeant 2010). Em 1978, com os estudos de Kan e Dozy, novo impulso foi dado ao estudo da HbS, para introdução de técnicas de biologia molecular (Naoum 1997; Claudino et al. 2003).

Apesar dos avanços, a AF continua sendo objeto de pesquisa devido à sua complexidade. Sua alteração molecular é causada por uma substituição da base nitrogenada adenina por timina no sexto códon do gene que codifica a cadeia β globina (*HBB*), localizado no *locus* 11p15.15 (Figura 1) (*HBB* rs334; β S GAG→GTG; glu6val) (Asare et al. 2010; Domingos et al. 2020a; Salinas Cisneros and Thein 2020)

Figura 1: Localização e organização dos genes do tipo beta-globina (família de genes do tipo beta – localização p15.5). Os genes funcionais estão representados como caixas escuras. A orientação de transcrição 5'-3' está da esquerda para a direita. Os genes do tipo beta são transcritos em direção ao telômero.

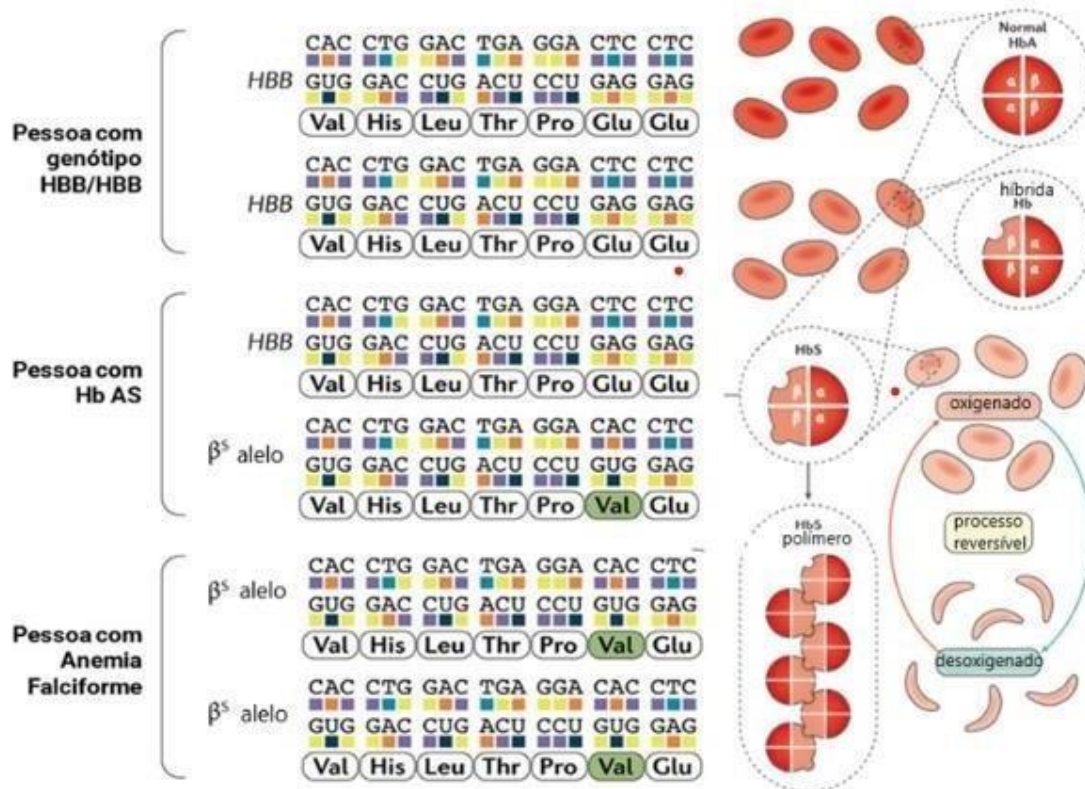


Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2024, p.15).

Em consequência dessa mutação, há formação de uma hemoglobina variante, a hemoglobina S (HbS), ao invés de sintetizar tetrâmeros de hemoglobina normal (Hb A). Na ausência do oxigênio, os tetrâmeros de hemoglobina S podem polimerizar no

interior das hemácias, fazendo com que elas assumam a forma falcizada ou falciforme (Kato et al. 2018; Williams and Thein; Allali et al. 2020). A doença falciforme (DF) pode apresentar vários genótipos como HbS/Talassemia (alfa/beta), HbSC e HbSD. Além disso, indivíduos com um alelo β^S apresentam o traço falciforme (HbAS) e a presença da HbS em homozigose (dois alelos β^S – HbSS) resulta na anemia falciforme (Figura 2) (Kato et al. 2018).

Figura 2: Alterações genéticas no gene da beta globina (HBB). Alterações genéticas no gene da beta globina (HBB). Indivíduos com hemoglobina A (HbA) possuem duas subunidades α -globina e duas subunidades β -globina. O alelo β^S , é resultante de uma substituição de adenina por timina levando a substituição do ácido glutâmico por valina na posição 6 da cadeia β -globina madura, formando a hemoglobina S. Indivíduos com um alelo β^S têm o traço falciforme (HbAS), enquanto indivíduos com anemia falciforme, possuem os dois alelos β^S .



Fonte: Adaptado de Kato et al. (2018, p.3)

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME

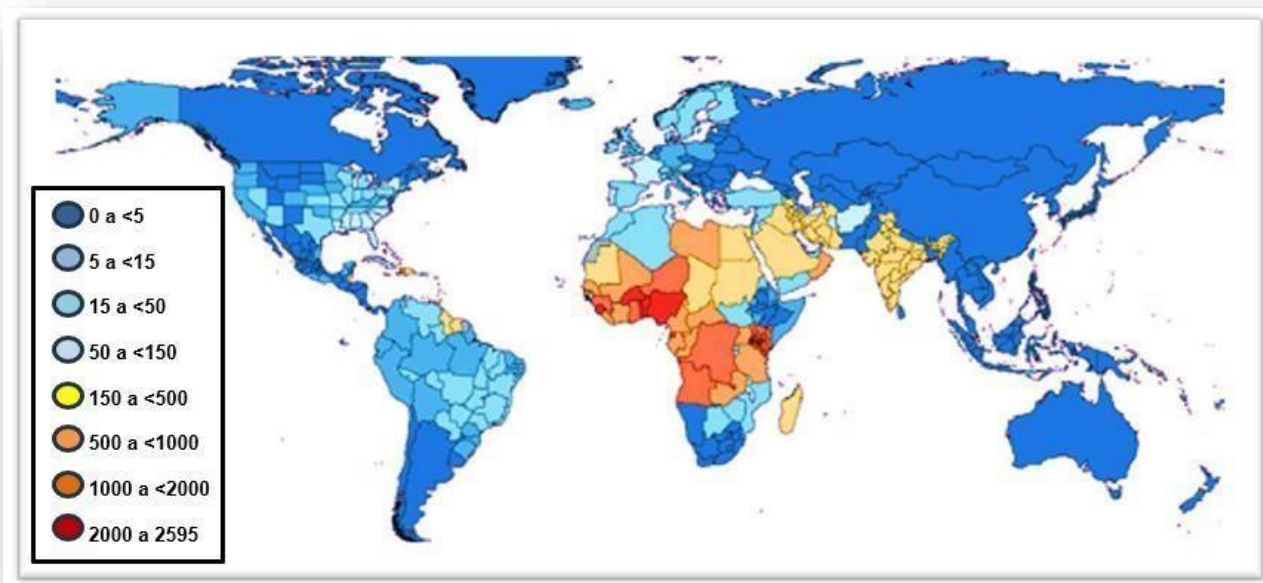
Anemia Falciforme (AF) é a doença hereditária grave mais comum no mundo cuja mutação do alelo β^S surgiu há mais de 7.000 anos no continente africano. Estima-se que, entre os anos de 2000 e 2021, o número de nascimentos, no mundo, atingiu cerca

de 515.000 crianças com AF, sendo a maioria dos casos ocorrendo na África Subsaariana (Thomson et al. 2023).

A alta prevalência na África está associada à proteção heterozigótica contra a infecção pelo *Plasmodium falciparum*. A AF também é prevalente em populações de ascendência africana, incluindo aquelas nas Américas, Europa, Oriente Médio e Índia. A doença contribui significativamente para a morbidade infantil que varia de acordo com o acesso à assistência médica e o diagnóstico precoce (Piel et al. 2013; Serjeant 2010).

Entre os anos de 2000 e 2021, o total de nascidos vivos com AF aumentou em 13,7%. Esse fato pode ser explicado pelo crescimento populacional no Caribe e África subsaariana ocidental e central. À época, o número de pessoas com DF no mundo aumentou 41,4%, de 5,46 milhões para 7,74 milhões e a taxa de mortalidade foi 11 vezes maior, no mesmo período (Figura 3) (Thomson et al. 2023).

Figura 3: Incidência de nascimentos de indivíduos com anemia falciforme por 100.000 nascidos vivos por país no ano de 2021.



Fonte: Adaptado de GBD 2021 Sickle Cell Disease Collaborators* (2021, p.e590).

Estima-se que até o ano de 2050 haverá mais de 400.000 pessoas com a doença. Fatores como o tráfico de pessoas escravizadas e a migração populacional promoveram a disseminação do alelo β^S por outras partes do mundo. No Brasil, as estimativas alcançam 60.000 a 100.000 pacientes com DF em todo o país (Kato et al.

2018; Martins de Castro et al. 2021). A dispersão da doença deu início com a chegada de pessoas escravizadas na região Nordeste para plantação de cana-de-açúcar e a extração de pedras preciosas no estado de Minas Gerais, favorecendo a maior incidência nessas áreas.

Acredita-se ainda que a miscigenação constante no Brasil tenha facilitado o aparecimento de hemoglobinas variantes em diferentes regiões. A diversidade cultural, geográfica e econômica do país exige programas de saúde pública para detecção precoce de doenças, pesquisa de casos suspeitos, confirmação diagnóstica, tratamento e acompanhamento dos pacientes (Silva-Pinto et al. 2019). A triagem neonatal no Brasil teve início em 1976, com a APAE - São Paulo realizando testes para fenilcetonúria (PKU). Em 1998, Minas Gerais foi pioneiro ao implementar um programa estadual universal de triagem neonatal para DF, integrando-o aos programas existentes para fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito (Silva-Pinto et al. 2019).

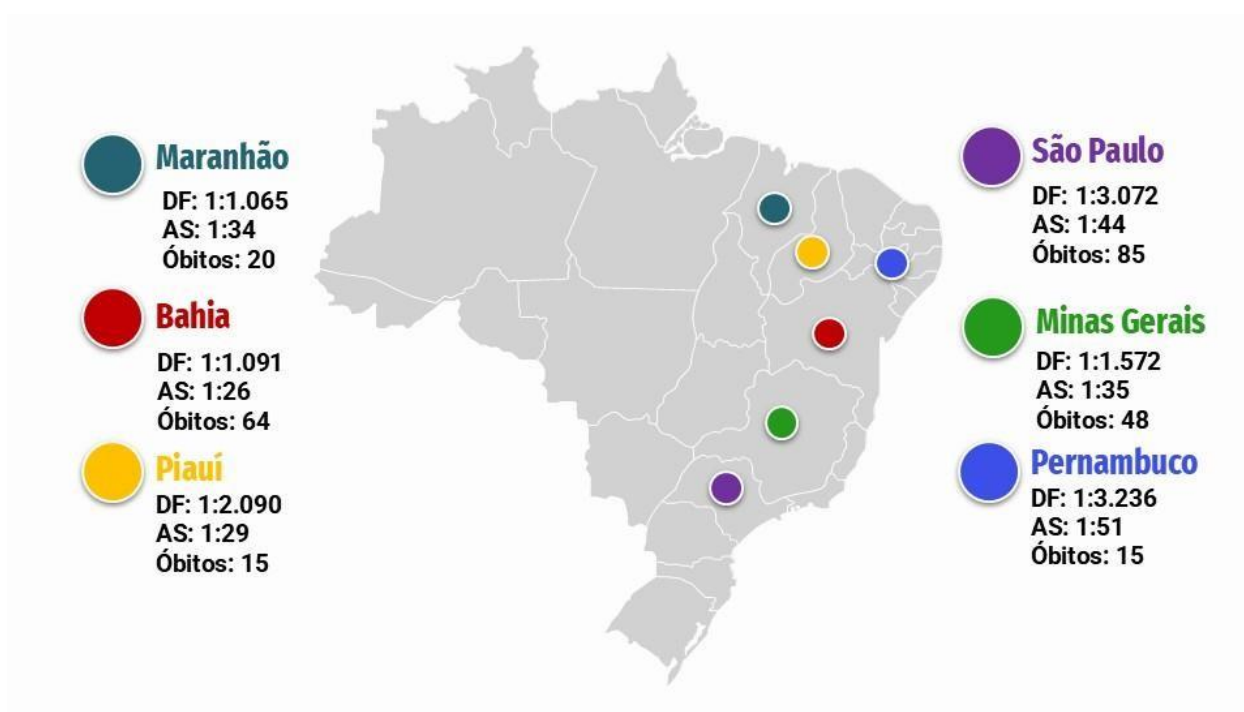
Porém, o programa foi oficializado, apenas no ano de 2001, pelo governo federal através da portaria de nº 822/01 e passou a ser chamado de PNTN (Programa Nacional de Triagem Neonatal). A inclusão da doença falciforme e outras hemoglobinopatias no PNTN pelo SUS nesse período reconhece essas patologias como um problema de saúde pública nacional. A taxa de cobertura do programa mantém-se desde 2006 acima de 85% em nível nacional, podendo variar de acordo com a região. No estado de São Paulo, por exemplo, o percentual de cobertura ultrapassa 95% (Silva-Pinto et al. 2019).

A incidência da anemia falciforme entre os nascidos vivos oscila significativamente entre os estados brasileiros, sendo mais alta em regiões com maior concentração de afrodescendentes. A Bahia foi a unidade federada de maior incidência (9,46 casos a cada 100 mil habitantes), devido à alta proporção de população afrodescendente no estado, seguida por São Paulo (6,52/100 mil habitantes) e Piauí (6,23/100 mil habitantes) (Ministério da Saúde 2024).

Segundo dados do Ministério da Saúde, os estados com maior número de óbitos incluem São Paulo (16,29%), Bahia (15,72%), Minas Gerais (12,73%) e Rio de Janeiro (12,33%) (Ministério da Saúde 2024). Enquanto isso, no estado de Pernambuco, a incidência de DF, no ano de 2021, foi de 1:3.236 nascidos vivos, de 1:51 nascidos vivos com traço falciforme e 15 óbitos atribuídos à DF (Figura 4) (PNTN-CGSH/DAET/SAES/MS 2023).

Com base nessas informações, é evidente a necessidade de intensificar os cuidados relacionados ao diagnóstico precoce, tratamento e aconselhamento genético dos pacientes acometidos e seus familiares. Essas medidas têm o potencial de reduzir tanto a morbidade quanto a mortalidade associada à doença, além de melhorar significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Portanto, é crucial que medidas governamentais no Brasil sejam aprimoradas e implementadas de forma descentralizada para ampliar o diagnóstico e o tratamento da anemia falciforme (Cordovil et al. 2023).

Figura 4: Estimativa de casos de doença falciforme (DF) e traço falciforme (AS) por nascidos vivos e óbitos por DF relatados no Brasil no ano de 2021.



Fonte: Autora, com dados extraídos do Relatório Anual de dados do PNTN, 2020-2022, Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM/MS e Plataforma Integrada de Vigilância em Saúde – Plataforma IVIS/MS.

2.3 FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME

Nas últimas décadas, vários estudos se dedicam ao entendimento da fisiopatologia da AF, que mostrou ser mais complexa do que se pensava, pois, além da polimerização da HbS, a cascata de eventos na AF conta com envolvimento do sistema imune inato, aumento da adesão entre leucócitos, plaquetas e o endotélio vascular; além da depleção de óxido nítrico (NO) (Steinberg 2008; Kato et al. 2018;

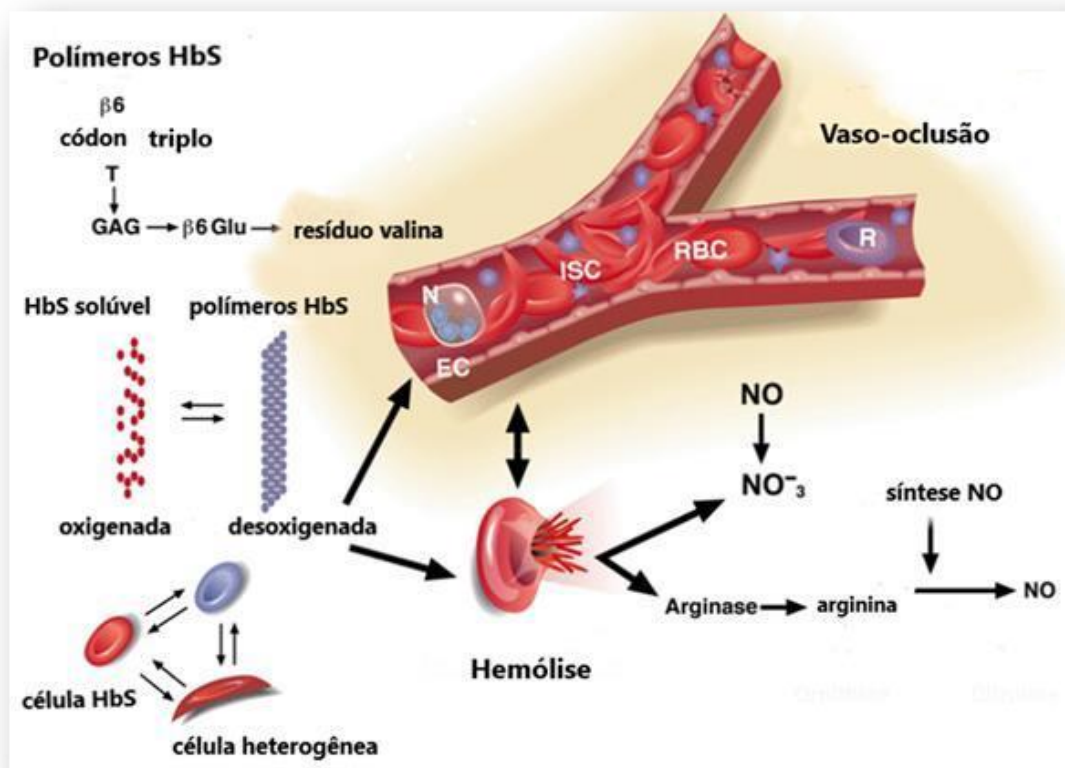
Allali 2020; Torres 2023).

A polimerização da HbS, evento inicial da fisiopatologia da AF, ocorre quando a molécula de hemoglobina está desoxigenada. Nesse estado, o aminoácido valina substituindo o ácido glutâmico leva à formação de ligações hidrofóbicas entre as cadeias de hemoglobina, resultando na formação de polímeros. Isso pode ser explicado, pois a valina é um aminoácido neutro (ponto isoelétrico $pI \sim 6$) e o ácido glutâmico é carregado negativamente ($pI = 2,8$). Essa troca altera o pI da HbS tornando-a menos negativa resultando em uma mobilidade mais lenta quando comparada à HbA, em eletroforese alcalina (pH 8-9). Ademais, o ácido glutâmico, na posição 6 da cadeia beta, auxilia no afastamento das moléculas desoxigenadas de hemoglobina, enquanto a valina favorece a polimerização sob condições de baixo teor de oxigênio (Kato et al. 2007; Nader et al. 2021; Torres 2023). Inicialmente, esse processo é reversível, mas, após vários eventos de oxigenação e desoxigenação, os polímeros de hemoglobina S se concentram dentro das hemácias alterando sua forma e tornando-as rígidas, de maneira irreversível (Kato et al. 2007; Kato et al. 2018).

O grau de polimerização da Hb S está relacionado à gravidade dos sintomas e complicações da doença e é influenciado por vários fatores, como o teor de oxigênio, pois quando a Hb S está totalmente oxigenada, ela permanece como um monômero solúvel; a maior concentração intraeritrocitária de Hb S eleva a probabilidade de formar polímeros, uma vez que há mais chances de interação entre as moléculas; e o baixo nível de 2,3-DPG, uma molécula que regula a afinidade da Hb S pelo oxigênio, promove o aumento da polimerização da Hb S. O pH, a temperatura e a presença de outras hemoglobinas como HbA e HbF (Fetal) também afetam o grau de polimerização (Steinberg, 2012; Ferrone 2018; Piccin et al. 2019).

Em consequência à polimerização da HbS, as hemácias sofrem mudanças conformacionais e assumem a aparência de foice, acarretando danos à membrana com perda da sua flexibilidade e resistência, redução de sua vida útil e maior aderência ao endotélio vascular o que dificulta a passagem pelos vasos sanguíneos. Acrescido a isso, a lise eritrocitária libera arginase, enzima que cataboliza a arginina, substrato para a síntese de óxido nítrico (ON - potente vasodilatador) favorecendo o processo de vaso-oclusão (Figura 5) (Buchanan et al. 2004; Kato et al. 2007; Gbotosho et al. 2021).

Figura 5: A fisiopatologia da doença falciforme. A HbS polimeriza quando desoxigenada, uma propriedade exclusiva de variantes da hemoglobina que apresentam a substituição da HbS. Quando uma quantidade crítica de polímero de HbS se acumula dentro de um eritrócito falciforme, ocorre lesão celular e um número suficiente de eritrócitos danificados causa o fenótipo da anemia falciforme, reconhecido por anemia hemolítica e vaso-oclusão. Estas células têm um tempo de vida encurtado (hemólise), algumas das quais ocorrem por via intravascular consumindo óxido nítrico (NO). Hemácias falciformes também promovem a vaso-oclusão.



Fonte: Adaptado de Steinberg M.H. (2008, p.1298)

2.4 HEMÓLISE, DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E INFLAMAÇÃO ESTÉRIL NA ANEMIA FALCIFORME

Clinicamente, as anormalidades eritrocitárias da AF se manifestam na anemia hemolítica e em ciclos de vaso-oclusão microvascular levando à lesão de isquemia-reperfusão de órgãos-alvo e infarto. Eventos vaso-oclusivos e hemólise intravascular promovem inflamação e instabilidade redox que levam à vasculopatia progressiva de pequenos e grandes vasos (Vats et al. 2020a).

A hemólise, na AF, acontece no meio intra e extravascular. No intravascular (cerca de 1/3 da hemólise total) a destruição eritrocitária é mediada pelo sistema complemento; enquanto no extravascular, ocorre principalmente via fagocitose por macrófagos teciduais mediados pelo SRE (Sistema Reticuloendotelial) (Kato et al.

2018; Piccin et al. 2019). Na hemólise intravascular há liberação de Hb (hemoglobina) livre que danifica o vaso e diminui a biodisponibilidade do ON. A oxidação da Hb forma metemoglobina (MetHb), uma molécula altamente reativa que gera espécies reativas de oxigênio (EROs) e libera heme livre que atua como DAMP (Padrão Molecular Associado a Dano) conduzindo a inflamação estéril na AF (Kato et al. 2018a; Torres and Hidalgo 2023; Osunkwo et al.)

Enquanto isso, o dano endotelial é prolongado pela ativação das células endoteliais, pelo heme livre e EROs resultando na superexpressão de moléculas de adesão (P-selectina, E-selectina, VCAM-1, ICAM-1) e liberação de citocinas, que por sua vez recrutam e ativam neutrófilos na circulação e promovem a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*), via ligação com o TLR4 (Receptor Toll Like 4), que podem contribuir para a vaso-oclusão (Nader et al. 2021; Torres and Hidalgo 2023). Tal evento compreende a obstrução de pequenos vasos, favorecida pelo fluxo sanguíneo mais lento e baixas concentrações de O₂ nessas áreas (Kutlar and Embury 2014; Conran and Belcher 2018; Conran and Embury 2021).

Dentre as moléculas de adesão, a P-selectina, também expressa na superfície de plaquetas, tem grande importância na vaso-oclusão, pois medeia o rolamento e adesão dos leucócitos e hemácias falcizadas à superfície do vaso (Kutlar and Embury 2014; Zhang et al. 2016).

A NADPH oxidase, a xantina oxidase (XO) e a NO-sintase endotelial (eNOS) geram espécies reativas de oxigênio (EROs) que contribuem para a disfunção endotelial. Tais fatores promovem a inflamação estéril (resposta inflamatória na ausência de microrganismos, desencadeada por danos às células) ativando a via do inflamassoma em células vasculares e inflamatórias para liberar formas pró-inflamatórias das citocinas IL-1 β e IL-18. Finalmente, a inflamação estéril promove ainda mais a vaso-oclusão, aumentando a adesividade dos neutrófilos, plaquetas e células endoteliais (Osunkwo et al. 2022; Torres and Hidalgo 2023; Sundd et al. 2025).

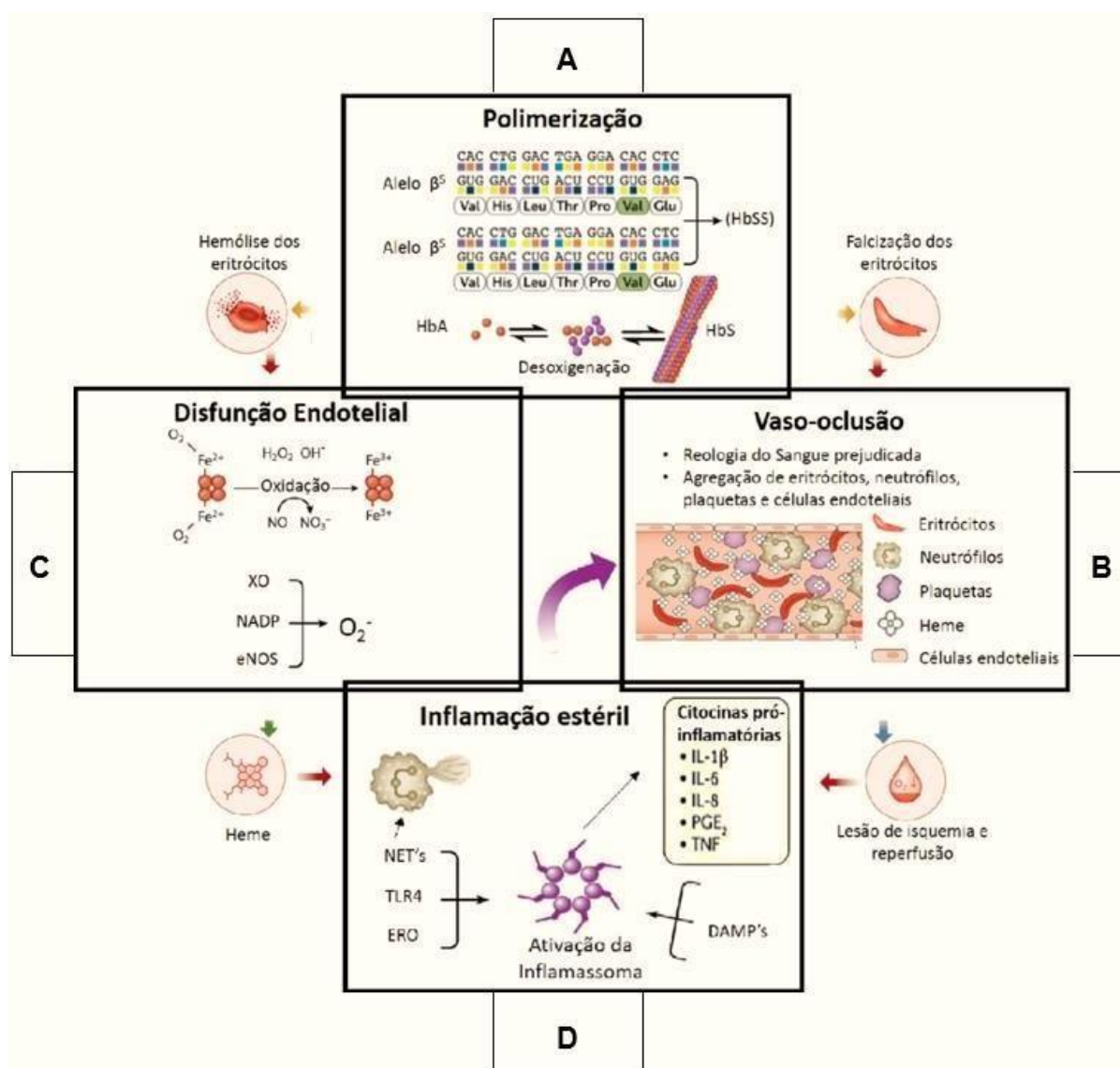
No processo inflamatório agudo, mediadores são liberados por células do sistema imune para conter a reação inflamatória e restabelecer a homeostase. Entretanto, se o estímulo persistir ou não for debelado, essa fase evolui para a cronicidade causando danos ao órgão. Tal cenário ocorre na arteriosclerose, diabetes mellitus, câncer, doenças autoimunes e AF (Torres and Hidalgo 2023).

Na AF, a hemólise é responsável pela inflamação estéril, sendo um importante marcador de severidade da doença. O heme livre, liberado através da hemólise, quando acumulado no plasma, é citotóxico e leva à formação de radicais pró-oxidantes. Além disso, pode induzir a inflamação pela ativação de macrófagos, neutrófilos e células endoteliais, secretar citocinas inflamatórias e promover a liberação de eDAMPs (Padrão Molecular Associado a Dano eritroide) que potencializam a inflamação. O heme livre também induz a produção de citocinas IL-1 β e IL-18 através do NLRP3 (do inglês *nucleotide-binding domain and leucine rich repeat containing family, pyrin domain containing 3*) um complexo multimérico citoplasmático de reconhecimento de danos (Sundd et al. 2019; Salgar et al. 2023).

Assim, o heme e a hemoglobina livre podem atuar como DAMPs na AF, ativando vias inflamatórias como NF-kB (Fator de Necrose kapa B) e NLRP3 intensificando a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-18. Esses processos contribuem para a inflamação estéril observada nessa condição (Nader et al. 2020; Nader et al. 2021).

Em resumo, a fisiopatologia da AF pode ser compreendida em quatro categorias: (1) polimerização da HbS desoxigenada, (2) biorreologia das hemácias prejudicada e vaso-oclusão mediada por adesão celular ao endotélio; (3) disfunção endotelial pela exposição dos produtos da hemólise e (4) inflamação estéril mediada por estímulo do receptor toll-like 4 e vias imunes inatas dependentes de inflamassomas. Esses processos moleculares e celulares culminam com dor aguda e crônica, lesão e falência dos órgãos-alvo na AF (Figura 6) (Sundd et al. 2019; Osunkwo et al. 2022).

Figura 6: Fisiopatologia molecular da doença falciforme. Fisiopatologia molecular da doença falciforme. a) O polimorfismo de nucleotídeo único na gen β -globina conduz à substituição de valina por ácido glutâmico na sexta posição na cadeia β -globina. Após a desoxigenação, a HbS polimeriza e forma feixes. Estes polimerizados resultam em eritrócitos (Hms) falciformes que, por sua vez, acarretam (b) prejuízo na reologia do sangue e agregação de Hms falciformes com neutrófilos, plaquetas e células endoteliais para promover a vaso-oclusão e posterior lesão de isquemia-reperfusão. Os feixes de polímeros também promovem hemólise, que (c) libera Hb livre na circulação. Hb(Fe²⁺) oxigenada promove disfunção do endotélio por depleção de reservas de óxido nítrico (NO) e gera nitrato (NO₃⁻) e metemoglobina (Fe³⁺). Além disso, NADPH oxidase, xantinoxidase (XO), e NO sintase endotelial não acoplado (eNOS) geram radicais livres oxidantes para promover disfunção endotelial. A metemoglobina (Fe³⁺) degrada-se para liberar heme livre, que age como um padrão molecular associado a dano eritrocitário (DAMP). (d) Espécies reativas de oxigênio (ROS), a ativação do receptor toll-like4 (TLR4), geração de neutrophil extracellular trap (NET), liberação de tecido ou célula-derivada DAMPs podem contribuir para a inflamação estéril pela via do inflamassoma vascular e células inflamatórias liberando IL-1 β . Finalmente, inflamação estéril promove vaso-oclusão através de uma alça de realimentação, promovendo adesividade dos neutrófilos, plaquetas e células endoteliais.



Fonte: Adaptado de Sundt et al. (2019, p.265)

Nas últimas décadas, estudos têm demonstrado a importância de biomarcadores por representarem um papel crucial na fisiopatologia e apresentação clínica da AF que foram baseados em testes laboratoriais convencionais. Dentre os marcadores de hemólise eleitos estão a dosagem da DHL (Lactato Desidrogenase), bilirrubina indireta e hemoglobina total. A concentração de HbF serve como indicador de anti-falcização; a contagem de reticulócitos, um marcador de hemólise e síntese eritropoética; e a pcr (proteína C reativa), um sensível indicador de inflamação. Pacientes falciformes com níveis mais altos de DHL, bilirrubina e reticulócitos; e Hb total mais baixa desenvolvem um fenótipo hemolítico exibindo, assim, o perfil do paciente falciforme (Osunkwo et al. 2022).

Um estudo brasileiro realizado por Belini e colaboradores avaliou a efetividade de uma calculadora ([http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/ Projects](http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects)) para criar um score de gravidade baseado nas complicações clínicas e dados laboratoriais em pacientes falciformes e classificá-los em categorias de acordo com o fenótipo. Os marcadores laboratoriais estudados incluíam a DHL, HbF, Hb total, contagem de reticulócitos, bilirrubina indireta, VCM (Volume Corpuscular Médio), Ht (hematócrito) e contagem de leucócitos, reforçando a importância desses biomarcadores para a especificação e acompanhamento desses pacientes (Belini Junior et al. 2015).

2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA ANEMIA FALCIFORME

A AF é uma condição grave e degenerativa que pode envolver vários sistemas orgânicos secundários à polimerização da HbS, aos fenômenos vaso-oclusivos e à anemia hemolítica (Conran and Embury 2021; Kavanagh et al. 2022). Esses eventos reunidos produzem danos a múltiplos órgãos, muitas vezes irreversíveis, e são responsáveis por complicações agudas e crônicas na AF a qual é caracterizada por alta morbidade e diminuição da expectativa e qualidade de vida tanto na infância como na vida adulta (Kato et al. 2018a; Pitanga et al. 2021a).

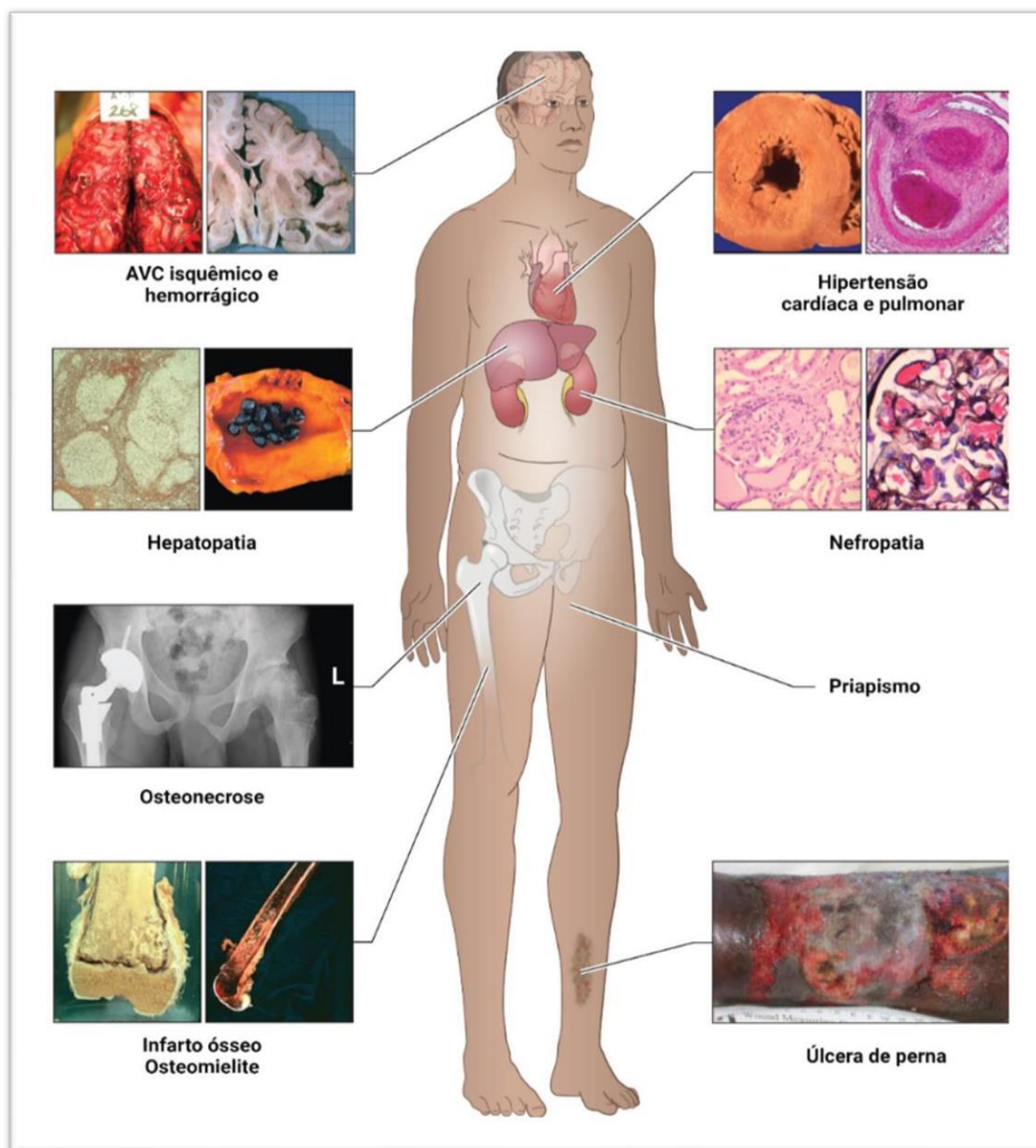
A variabilidade clínica e danos progressivos a múltiplos órgãos são uma característica constante na AF; contudo, as causas envolvidas ainda não são totalmente compreendidas (Williams and Thein 2018). Os sintomas clínicos podem surgir após o sexto mês de vida, período em que há predomínio de síntese de cadeias globínicas β^S (Pitanga et al. 2021a). Uma das manifestações precoces, de 0 a 3 anos, mais comuns da AF é a síndrome mão-pé, que se caracteriza pelo inchaço

doloroso de uma ou mais extremidades devido ao infarto da medula dentro dos pequenos ossos das mãos e dos pés (Williams and Thein 2022). A crise de dor é uma manifestação aguda que aparece após os 6 meses de vida atingindo mais as extremidades, tórax, abdômen ou costas (Steinberg and Sebastiani 2012).

O priapismo, complicação aguda que atinge a infância, é uma ereção indesejada e dolorosa do pênis que dura mais de 2 horas, é frequentemente recorrente, apresentando uma prevalência ao longo da vida de 20-89% em meninos e homens (Kavanagh et al. 2022). Outra complicação aguda comum da AF é a síndrome torácica aguda (STA) que apresenta um quadro clínico (incluindo tosse, falta de ar e sinais de consolidação e hipoxemia) difícil de distinguir da pneumonia aguda (Kavanagh et al. 2022). A lesão renal aguda é um evento pouco reconhecido que, em uma série de casos prospectivos, complica 8% de todas as internações com STA em crianças. Por fim, o AVC (Acidente Vascular Cerebral) em crianças com AF é causado principalmente por vasculopatia, levando à obstrução de grandes artérias cerebrais e exigindo transfusão emergencial de hemácias. Trata-se da complicação aguda mais grave e devastadora dessa doença (Kavanagh et al. 2022).

Com o aumento da sobrevida, o desenvolvimento de manifestações crônicas e complicações cumulativas na AF está se tornando cada vez mais evidente em adultos em países de alta renda. Dentre as complicações crônicas, o hiperesplenismo é o mais precoce surgindo na primeira infância. A colelitíase, falência renal, insuficiência cardíaca, hipertensão pulmonar, osteonecrose e úlceras de perna aumentam a frequência com a idade (Figura 7) (Alavi and Kirsner 2015; Williams and Thein 2018; Inusa et al. 2019; Conran et al. 2021; Migotsky et al. 2022; Reparaz et al. 2022).

Figura 7: Complicações clínicas comuns da anemia falciforme. Complicações clínicas comuns da anemia falciforme. Embora algumas complicações estejam relacionadas com a idade, alguns pacientes são geneticamente predispostos a determinadas complicações. Variantes genéticas tem sido identificada para algumas manifestações clínicas.



Fonte: Adaptado de Williams & Thein (2018, p.36).

2.5.1 Úlceras maleolares na Anemia Falciforme

As úlceras maleolares (UM) ou úlceras de perna na AF podem ser graves, incapacitantes e causar isolamento social. Elas foram descritas desde o início do século XX, sendo consideradas as manifestações cutâneas mais presentes na AF, e aparecem a partir da segunda década de vida aumentando a frequência após os 30

anos (Tolu et al. 2022).

Apesar da etiologia das UMs ainda não ser bem elucidada, sabe-se que sua prevalência e incidência podem variar de acordo com a distribuição geográfica, fatores ambientais, faixa etária, genótipos da AF, moduladores genéticos e evolução da doença (Monfort and Senet 2020; Pitanga et al. 2021; Dick et al. 2023). A prevalência de úlceras de perna pode variar geograficamente em índices que vão desde 1% na Arábia Saudita até 75% na Jamaica. Estimativas mostram que a prevalência em Gana é de 18,6%, na Itália 3,5% (Pitanga et al. 2021a), e na América do Norte os valores atingem em torno de 8 a 10% (Dick et al. 2023; Thomson et al. 2023).

No Brasil, a prevalência dessas úlceras atinge 20% dos casos de DF e 22% dos casos com AF (Ministério da Saúde 2012). Elas surgem mais frequentemente entre 10 e 25 anos e são raras antes dos dez anos de idade (Granja et al. 2020). Entre os anos de 2013 e 2017, um estudo avaliou 1.109 pacientes com 18 anos ou mais com DF de uma coorte brasileira para verificar a prevalência de UMs a qual foi superior (21%) à descrita em países desenvolvidos (Reis de Souza et al. 2023). Em contrapartida, uma pesquisa desenvolvida no estado de Minas Gerais, Brasil, mostrou uma prevalência de 1,4% de pacientes acima de 18 anos com AF e UMs (Otoni Spira et al. 2022).

2.5.2 Fisiopatologia das Úlceras Maleolares na Anemia Falciforme

Estudos anteriores relacionavam a formação da UM com eventos de vaso-oclusão, infarto e necrose tecidual (Minniti et al. 2010a; Aldallal 2019). Recentemente, o papel do ON tem demonstrado que pacientes que exibem níveis mais baixos deste radical livre estão mais suscetíveis à vasoconstrição e disfunção endotelial favorecendo o quadro de isquemia, infarto e possível ulceração. Esse fato é explicado pela hemólise intravascular que promove o sequestro do ON através da Hb livre (Dick et al. 2023; Patel et al. 2024).

Ademais, o papel da doença venosa crônica nas UMs tem sido evidenciado, pois a insuficiência de valvas venosas que drenam a área do tornozelo e a elevação da pressão venosa proporcionam a cicatrização lenta e o surgimento das UMs (Granja et al. 2020; Domingos et al. 2020a).

No Brasil, estudos recentes exibiram níveis elevados da citocina pró-inflamatória IL-8 em pacientes com AF e UMs ressaltando o papel da inflamação nessas lesões e sugere que a IL-6 seja um marcador de mau prognóstico (Domingos et al. 2020; Granja et al. 2020). Monfort e colaboradores avaliaram a incidência das UMs e sua relação com os níveis de HbF e Hb total na AF. O risco de aparecimento de UM aumenta quando os valores desses marcadores estão diminuídos (Monfort and Senet 2020).

Em 1967, a hidroxiureia (HU), uma droga citostática foi aprovada pelo FDA norte-americano inicialmente para tratamento de doenças neoplásicas, psoríase e policitemia vera. Apenas em 1998, a HU passou a fazer parte da prática terapêutica para pacientes com DF e se tornou, nos anos subsequentes, o primeiro medicamento que comprovadamente previne complicações clínicas. É uma droga que inibe a replicação do DNA na fase S do ciclo celular, estimula a síntese de cadeias globínicas gama e aumenta a síntese intraeritrocitária de Hb F (Cançado et al. 2009; Lewis et al. 2024). Sendo assim, a HU é amplamente utilizada para o tratamento da AF devido ao seu efeito na redução das crises de dor e de transfusões (Singh and Minniti 2016; Granja et al. 2020).

Por outro lado, tem sido relatado que este medicamento pode precipitar o aparecimento de úlceras de perna (Granja et al. 2020). Tolu e colaboradores não acreditam nessa associação e relatam que não observaram diferenças entre pacientes com úlceras de perna que tomaram HU em relação à duração de úlceras ou resposta ao tratamento. Esses autores consideram que os benefícios da HU justificam a sua manutenção, mas recomendam suspender caso ocorra formação de UM ou não suceda sua redução após 6 meses de tratamento (Tolu et al. 2022).

Por fim, a isquemia, o dano tecidual e a inflamação promovem um cenário favorável à ulceração (Granja et al. 2020; Patel et al. 2024) e, embora seja comum, a resposta ao tratamento das UMs na AF é pior do que feridas de outras etiologias (Granja et al. 2020).

2.5.3 Sintomas clínicos das Úlceras Maleolares na Anemia Falciforme

As UMs são bastante dolorosas, progressivas, recidivantes e podem surgir espontaneamente ou após um trauma, o que compreende a metade dos casos. Elas afetam a pele nos maléolos medial ou lateral e em regiões de pouca gordura

subcutânea, podem apresentar limites definidos e bordas elevadas ou coalescerem formando uma única lesão (Figura 8) (Granja et al. 2020; Dick et al. 2023; Patel et al. 2024; Dudhe et al. 2024).

Figura 8: Imagens de úlceras maleolares em paciente com anemia falciforme, em tratamento.



Fonte: Adaptado de Granja et al. (2020, p.5)

As UMs podem ser classificadas em agudas e crônicas de acordo com o tempo necessário para atingir a cicatrização. As agudas melhoram em um mês, no mínimo, e as crônicas permanecem ao menos por seis meses até anos. A cicatrização é lenta e depende de fatores gerais e específicos ao local da lesão. Os gerais incluem medicação, nutrição, doença primária e idade. Os fatores ligados ao local da lesão são infecções, agentes tópicos, necrose tecidual, suprimento sanguíneo e cobertura adequada (Aldallal et al. 2019; Patel et al. 2024). Além disso, a cicatriz formada tem baixa resistência à tração e grandes chances de reabertura (Granja et al. 2020).

2.5.4 Tratamento das Úlceras Maleolares na Anemia Falciforme

Atualmente, o manejo das UMs na AF é realizado através da prevenção e tratamento. As medidas preventivas, essenciais no monitoramento das UMs, incluem controle de infecções, cuidados com feridas, uso de bandagens, desbridamento e manejo cirúrgico. O desbridamento serve para remover o tecido necrótico que interfere na cicatrização. Além dessas, o paciente deve usar meias de algodão, calçados confortáveis, repelentes e hidratantes para evitar ressecamento e escarificação da

pele. Os hidrocoloides, hidrogéis e colágeno auxiliam na manutenção da umidade do ambiente e por ter propriedades anti-inflamatórias (Aldallal et al. 2019; Granja et al. 2020).

Nas últimas décadas, o ON está sendo visto como uma molécula benéfica no processo inicial e tardio de cicatrização de feridas devido à produção de matriz extracelular, modulação da resposta imunológica à ferida, proliferação de queratinócitos, angiogênese e sua atividade antiplaquetária (Singh and Minniti 2016). Estudos indicam que terapias voltadas à restauração da biodisponibilidade do ON podem ser benéficas. O ânion nitrito atua como vasodilatador *in vivo*, promovendo a geração de ON em tecidos com baixa tensão de oxigênio e pH, condições provavelmente presentes em feridas crônicas. Uma pesquisa multicêntrica, fase 1, prospectiva e randomizada revelou melhora do fluxo sanguíneo regional, diminuição da dor da úlcera e indícios de melhora da cicatrização da úlcera. Tais dados em ensaios clínicos maiores, as terapias baseadas em ON têm potencial para transformar o tratamento de úlceras nesses indivíduos (You et al. 2019).

2.6 MODULADORES GENÉTICOS DA ANEMIA FALCIFORME

Apesar da AF ser uma doença mendeliana, esta doença apresenta uma importante variabilidade clínica. Enquanto alguns pacientes apresentam a maioria dos subfenótipos clínicos e laboratoriais dessa doença, outros têm poucos sintomas e raramente necessitam de intervenção clínica (Domingos et al. 2019).

Evidências afirmam que há uma heterogeneidade molecular que distingue os pacientes com DF, sugerindo que outros fatores possam contribuir para a severidade da doença, incluindo modificadores genéticos (Pincez et al. 2022). Esses fatores genéticos incluem a associação entre a AF e os haplótipos do agrupamento do gene da globina β^S , a presença de talassemia alfa (α) e a concentração de hemoglobina fetal (de Freitas Dutra et al. 2022). Além disso, estudos conjecturam que fatores ambientais como clima, qualidade do ar, além de fatores socioeconômicos como perfil nutricional e acesso aos serviços sociais e de saúde especializados podem influenciar a variabilidade clínica da doença (Piel et al. 2017; Williams and Thein 2018).

O principal tipo de variação no complexo gênico das globinas alfa ou beta é causado por mutações em sequências que afetam o sítio de reconhecimento de

enzimas de restrição. O conjunto de combinações desses sítios polimórficos em um cromossomo é chamado de haplótipo (Bakioglu et al. 1985; Nagel et al. 1992; Claudino et al. 2003). A identificação do haplótipo do cluster do gene β^S e do estado mutacional do gene α é útil para detectar precocemente pacientes com anemia falciforme (SS) de alto risco, pois os diferentes haplótipos do gene β^S influenciam o curso clínico da doença (Serjeant and Vichinsky 2018).

Os principais haplótipos têm sido relatados em diferentes regiões do mundo e são relacionados com países ou áreas do continente africano ou próximo a este, recebendo as denominações de acordo com os locais de sua origem: Benin (BEN), Bantu/República Centro-Africana (CAR), Senegal (SEN), Camarões, Arábia Saudita e Índia (ARB) (Claudino et al. 2003). O haplótipo CAR aumenta o risco de desenvolver complicações irreversíveis em idade precoce, tanto na África quanto na América. Por outro lado, a presença do haplótipo SEN está associada a um melhor prognóstico do paciente devido à concentração elevada de HbF; enquanto no BEN a gravidade é intermediária. Esses marcadores genéticos podem ser usados para identificar pacientes em risco antes do início de falências orgânicas irreversíveis (Powars D, Hiti A 1993; Bernaudin et al. 2018).

A inativação parcial ou deleção dos genes da alfa globina resulta na talassemia alfa. Estudos observaram que a concomitância de mutações da talassemia alfa na AF reduzia a gravidade clínica da doença falciforme, pois ao diminuir os níveis de subunidades da alfa globina, há menor concentração da HbS reduzindo, portanto, a polimerização (Embury et al. 1982; Higgs et al. 1989; Adekile 2021; Hatzlhofer et al 2021; Pincez et al. 2022).

A HbF é composta por duas subunidades de cadeias alfa (α) e duas subunidades de cadeias γ (gama) e aparece em maior concentração ao nascimento. Após essa fase, ocorre uma mudança na expressão do gene que codifica a β globina e as subunidades γ são substituídas pela beta (β) para formar a HbA (adulto). Na AF, quando a HbF está elevada, a HbS não consegue polimerizar, prevenindo a hemólise e a vaso-occlusão, atenuando a severidade da doença. Portanto, tal medida pode ser usada como tratamento, haja vista que a HU age aumentando os níveis de HbF (Menzel S, Thein SL. 2019; Adekile 2021; Pincez et al. 2022). Além do mais, estudos de associação têm mostrado que 20%-50% da variação na HbF, pode ser explicada pela influência de variantes de nucleotídeos únicos (SNVs) em 3 *locus*: *BCL11A*, *HBS1L-MYB* e o *locus*

de globina β -like. O *BCL11A* codifica um potente repressor transcricional dos genes da γ globina (*HGB1* e *HGB2*). Portanto, a redução da expressão eritroide de *BCL11A* se tornou alvo para pesquisas de terapia gênica (Adekile 2021; Kirkham et al. 2023).

A ocorrência das UMs na AF também pode ser influenciada pela associação de moduladores genéticos, como os genes envolvidos no metabolismo de ON e na adesão celular (Conran and Belcher 2018a; Domingos et al. 2020a). Um estudo desenvolvido por Nolan e colaboradores mostrou a relação de UM com hemólise, por meio de marcadores laboratoriais, e com SNVs em genes que poderiam afetar a vaso-oclusão falciforme. Quatro SNVs em *Klotho* (*KL*) foram associados a um risco aumentado de úlceras de perna juntamente com sete SNVs na via TGF- β /BMP nos genes *BMPR1B*, *MAP2K*, *MAP3K7*, *SMAD7*, *SMAD9* e *SMURF1*. Os dados sugeriram que fenótipos hemolíticos, como o da UM, podem ser melhorados por agentes que aumentem a biodisponibilidade do ON ou que reduzam a densidade eritrocitária e que a ocorrência de UMs está fortemente relacionada com a intensidade da hemólise (Nolan et al. 2009). Além dos descritos acima, um estudo transversal exibiu associação entre alguns polimorfismos dos genes das *IL-1 β* e *IL-6* com determinadas complicações clínicas da AF, como a UM, podendo atuar como preditores genéticos de gravidade da doença (Vicari et al. 2015).

Em outro trabalho, foram estudadas seis variantes em genes que estão relacionados à proliferação (*CRYBG3* e *UBTFL1*), morfogênese epidérmica (*KRT77*), inflamação (*TNFRSF25*), transcrição (*ZNF540*) e coagulação (*VWDE*). Tais eventos podem estar envolvidos no desenvolvimento de úlceras de perna na AF e o estudo desses genes pode representar um papel importante na etiologia das úlceras de perna na AF como modificadores genéticos (de Carvalho-Siqueira et al. 2019).

Os miRNAs, como o miR-130a, têm sido identificados como moduladores genéticos na AF e UM. Batista e colaboradores observaram que a maior expressão do mi-R130a e a diminuição dos níveis séricos de leptina podem estar relacionadas com as UMs na AF. O miR-130a regula o receptor de leptina (LepR), e esses fatores podem contribuir para a cronicidade das lesões, possivelmente retardando os processos de reparo e cicatrização tecidual. No entanto, os mecanismos exatos desses processos ainda são desconhecidos (Batista et al. 2022).

Ademais, estudos evidenciam que as células falciformes induzem a inflamação através de DAMPs como o grupo heme, HMGB1 (do inglês, *High-mobility group box*

1) (Conran and Belcher 2018a) ou ácido úrico que causam inflamação. O heme, originado da hemólise, é um mediador de injúria vascular e inflamação (Cerqueira et al. 2011; de Freitas Dutra et al. 2022; Alagbe et al. 2022; Salgar et al. 2023a). Dentre as moléculas inflamatórias, o complexo inflamassoma e as IL-1 β e IL-18 ganham atenção no contexto da AF, pois parecem modular a heterogeneidade clínica da doença (de Freitas Dutra et al. 2022). Portanto, a compreensão desses fatores que influenciam a fisiopatologia e a diversidade fenotípica da AF e das UMs é crucial para o desenvolvimento de terapias mais direcionadas e efetivas (Domingos et al. 2020; Alagbe et al. 2022).

2.7 INFLAMASSOMAS

A inflamação é um mecanismo de defesa caracterizado por uma cascata de sinais que ativam a resposta imune inata (Blevins et al. 2022) e pode ser induzida por PAMPs (Padrão Molecular Associado a Patógenos) ou DAMPs (Salgar et al. 2023a). Os PAMPs podem ser representados por microrganismos como lipopolissacarídeos (LPS) encontrados nas membranas de bactérias Gram-negativas, ácidos nucleicos bacterianos ou virais, peptídeos bacterianos como a flagelina e polissacarídeos como os β -glucanos (Mahla RS et al. 2013; Blevins et al. 2022). Os DAMPs são biomoléculas endógenas liberadas quando há dano tecidual, como, por exemplo, proteínas associadas à cromatina, proteínas de choque térmico, ácido úrico e fragmentos de matriz extracelular, além de injúria ou morte celular (Erdei et al. 2018; de Freitas Dutra et al. 2022; Blevins et al. 2022).

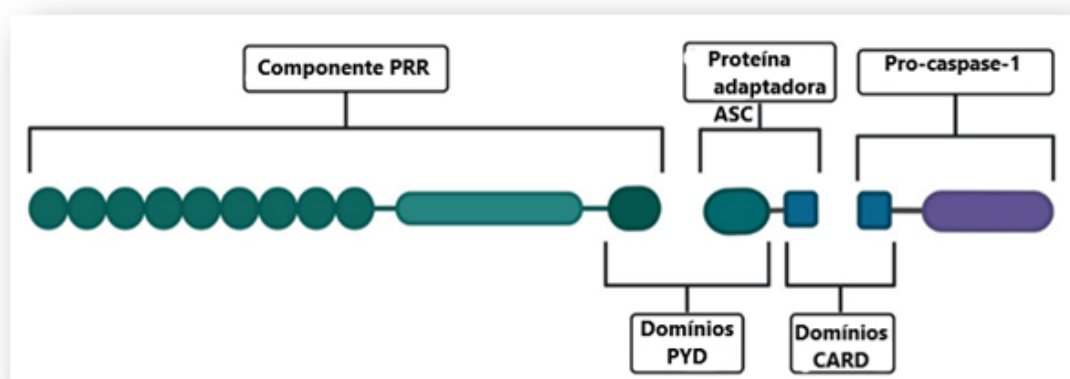
A ativação da resposta imune inata acontece pelo reconhecimento de danos através de PRRs (Receptor de Reconhecimento de Patógeno) celulares (Accogli et al. 2023). Dentre esses já foram descritos os TLRs (receptores Toll-like), os receptores de lectina tipo C (CLRs, do inglês *C-type lectin receptors*), os receptores semelhantes a RIG-I (RLRs, do inglês *RIG-I-like receptors*) e os receptores semelhantes a domínios de oligomerização e ligação de nucleotídeos (NOD, do inglês *nucleotide binding and oligomerization domain*) ricos em repetições de leucina (NLRs) (Hafner-Bratkovič 2023; Accogli et al. 2023). Os receptores TLRs e CLRs são complexos transmembranares que agem na superfície celular e os RLRs e NLRs reconhecem estruturas do meio intracelular (Seoane et al. 2020).

Estudos mostraram que os receptores NLRs participam da formação do

inflamassoma, uma plataforma proteica intracelular descrita há 20 anos que desempenha um papel vital na clivagem e consequente liberação de formas ativas de citocinas pró-inflamatórias que agem em resposta a PAMPs ou DAMPs (Meyers and Zhu 2020; de Freitas Dutra et al. 2022; Blevins et al. 2022; Hafner-Bratkovič 2023; Accogli et al. 2023). Desde então, diversos inflamassomas têm sido descritos devido ao seu papel importante contra patógenos e na inflamação estéril (Hafner-Bratkovič 2023). Além disso, é considerado um candidato promissor para modular a heterogeneidade clínica em pacientes falciformes (Yang et al. 2019; de Freitas Dutra et al. 2022).

Os inflamassomas são formados por três elementos principais: um sensor/receptor, um adaptador e um efetor. Eles se diferenciam em dois grupos de acordo com o sensor intracelular que pode ser predominantemente os receptores NLRs ou os receptores do tipo AIM2 (ausente no melanoma 2) (Yang et al. 2019; Meyers and Zhu 2020; Hafner-Bratkovič 2023) (Figura 9).

Figura 9: Componentes do inflamassoma: esquema geral. PRR — componente que detecta sinais de ativação do inflamassoma. ASC - proteína adaptadora que permite a associação de PRR com pró-caspase-1. Pro-caspase-1- componente efetor do complexo inflamassoma. Domínios PYD — Domínios que permitem a associação do PRR com o ASC. Domínios CARD — Domínios possibilitando a associação da pró-caspase-1 com o complexo PRR-ASC. Abreviações: PRR— Pattern-receptor de reconhecimento; ASC — Proteína speck-like associada à apoptose contendo um domínio de recrutamento de caspase.



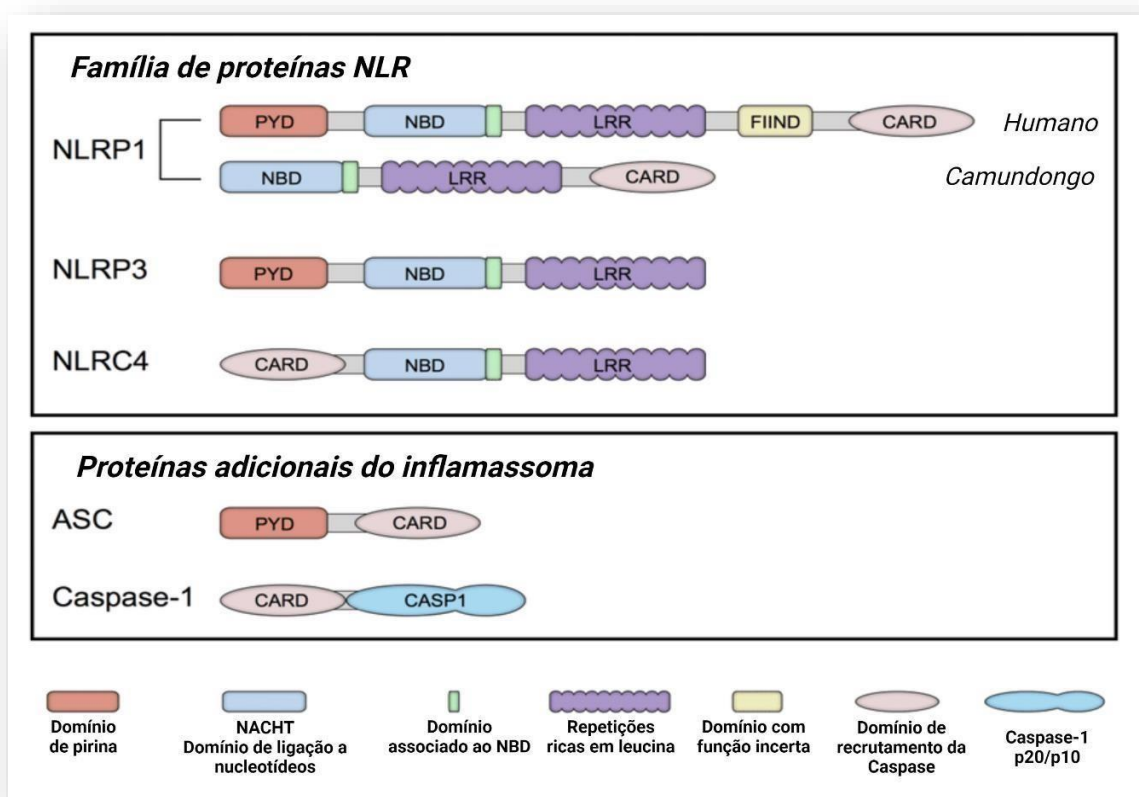
Fonte: Criado com Biorender (2023).

As proteínas adaptadoras promovem a interação entre as proteínas sensoras e efetoras. A proteína adaptadora do tipo *speck* associada à apoptose contendo um domínio de recrutamento de caspase (CARD) (ASC, do inglês *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) possui um domínio de pirina (PYD) amino-

terminal para interação com o sensor e um domínio CARD para ligação a várias proteínas efetoras de caspase (Hafner-Bratkovič 2023a). Quanto à proteína efetora, a pró-caspase-1 é a mais comum (Figura 9) (Jiménez-Castro et al. 2019).

Até o momento, vários inflamassomas foram descritos, incluindo NLRP3, NLRP1, AIM2 e NLRC4 (Figura 10). O inflamassoma NLRP3 é uma proteína PRR citosólica de 118 kDa expressa por diversas células, como neutrófilos, macrófagos, micróglias, linfócitos, células epiteliais, osteoblastos, neurônios e células dendríticas (Blevins et al. 2022). Ele é composto por uma molécula sensora NLRP3, a proteína adaptadora ASC e a pró-caspase-1. A proteína NLRP3 contém um domínio de repetição rica em leucina (LRR) C-terminal, um domínio NACHT central contendo ATPase que medeia a oligomerização, e um domínio N-terminal de pirina (PYD) que recruta proteínas para a formação de complexos de inflamassoma (Kelley et al. 2019; Blevins et al. 2022).

Figura 10: Componentes estruturais dos inflamassomas. Células derivadas de monócitos são capazes de montar uma variedade de inflamassomas dependendo do estímulo ativador. Aqui são mostrados exemplos selecionados de sensores de inflamassoma da família NLR, bem como os componentes ASC (também chamado de Pycard) e Caspase-1. A disposição e a ordem dos domínios são as principais diferenças entre as proteínas sensoras NLR, enquanto a variação específica da sequência nos domínios NAD confere especificidade a ligantes selecionados.



Fonte: Adaptado de Yaron, J.R. (2015, p.17).

Este complexo pode ser ativado por uma variedade de estímulos, que incluem ATP, EROs, toxinas formadoras de poros, agregados, cristais, nanopartículas, patógenos e seus componentes, além de alguns fármacos como o Imiquimode (Blevins et al. 2022; Hafner-Bratkovič 2023).

O ATP extracelular atua como agonista do NLRP3 e induz o efluxo de K^+ através de um poro purinogênico P2X7-dependente. Isso leva à ativação e montagem do inflamassoma NLRP3, com o efluxo de K^+ , importante ativador, além do ATP extracelular e toxinas formadoras de poros serem os principais desencadeadores da secreção de IL-1 β pelo inflamassoma. Além disso, fluxos de Ca^{2+} intracelular também podem ativar o inflamassoma NLRP3 (Shao et al. 2015; Hafner-Bratkovič 2023).

Os PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) e DAMPs conhecidos, desencadeiam a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que por sua vez induzem a montagem do inflamassoma NLRP3. Danos à NADPH oxidase e outros sistemas oxidativos por ROS mitocondriais também podem ativar o inflamassoma (Shao et al. 2015).

Além do mais, acredita-se que algumas substâncias irritantes ambientais, como sílica, amianto e β -amiloide, causem a formação de estruturas cristalinas ou particuladas quando fagocitadas, levando à montagem e ativação do inflamassoma NLRP3 (Swanson et al. 2019). Esses irritantes causam ruptura lisossômica e liberação de conteúdo lisossomal por um mecanismo mediado pela catepsina B. Estímulos cristalinos, como a sílica, são os principais desencadeadores da secreção de IL-1 β pelo inflamassoma, mas também existem outros fatores que podem ativar o inflamassoma NLRP3, como dano mitocondrial, ruptura lisossômica, disfunção autofágica e atividade da proteína de interação com tioredoxina (TXNIP) (Shao et al. 2015). Logo, a ativação do inflamassoma consiste na interação entre a proteína NLRP3 e a região N-terminal da proteína adaptadora ASC via interações PYD-PYD. A região C-terminal da ASC tem um domínio de recrutamento de caspase (CARD) que pode se ligar à pro-caspase-1 via interações CARD-CARD para promover a dimerização e ativação da caspase. Devido às suas propriedades semelhantes a prions, a ASC forma grandes agregados fibrilares conhecidos como "specks" (Yang et al. 2019; Paik et al. 2021; Liu et al. 2022; Hafner-Bratkovič 2023; Accogli et al. 2023). Como resultado, a formação desse complexo promove a autoclivagem da caspase-1 gerando o tetrâmero ativo da caspase p10/p20 e induzindo a liberação das

interleucinas 1 β e 18 em formas biologicamente ativas, além de promover a piroptose que é regulada pelo domínio N-terminal da gasdermina D (GSDMD) formando poros na membrana plasmática (Yang et al. 2019; Alehashemi and Goldbach-Mansky 2020; Paik et al. 2021; Salgar et al. 2023a; Accogli et al. 2023).

Embora a localização exata do inflamassoma NLRP3 ainda seja incerta, alguns estudos indicam, que, em condições de repouso, o NLRP3 está presente no retículo endoplasmático (RE) e citosol. Quando ativado, ele se redistribui para membranas associadas à mitocôndria (MAMs) e mitocôndrias. No entanto, um estudo sugere uma localização exclusivamente citosólica (Paik et al. 2021; Missiroli et al. 2021).

O inflamassoma AIM2 (ausente no melanoma 2) pode recrutar pró-caspase-1 via ASC para formar o complexo AIM2–ASC–pró-caspase-1. Ao contrário de NLRP3 e AIM2, a proteína NLRP1 contém domínios PYD e CARD, que interagem diretamente com a pró-caspase-1 sem a proteína adaptadora ASC, mas a presença de ASC pode aumentar a ativação da caspase-1 mediada por NLRP1 (Yang et al. 2019; Paik et al. 2021; Wortmann et al. 2022; Hafner-Bratkovič 2023). O inflamassoma NLRC4 pode ser ativado por bactérias patogênicas, como *Salmonella*, *Shigella* e *Pseudomonas aeruginosa*, promovendo a secreção de IL-1 β e IL-18 (Yang et al. 2019; Paik et al. 2021; Wortmann et al. 2022).

Nas últimas décadas, houve um estudo aprofundado sobre a composição molecular e o mecanismo de ativação de diversos inflamassomas. No entanto, atualmente, as evidências indicam que o inflamassoma NLRP3 é o mais investigado e detalhado, devido à sua habilidade de ser ativado por uma variedade de estímulos (JO E-K et al. 2015). Além disso, sabe-se que a desregulação do inflamassoma está ligada a distúrbios inflamatórios como CAPS (Síndrome Periódica Associada à Criopirina), Alzheimer, Diabetes, Gota, doenças autoinflamatórias e Aterosclerose. Portanto, é essencial controlar a ativação do inflamassoma para prevenir a presença de hospedeiros indesejados, danos e inflamação excessiva. Até agora, diversos mecanismos de regulação foram identificados na ativação do inflamassoma NLRP3 (Paik et al. 2021; Liu et al. 2022; Blevins et al. 2022; Accogli et al. 2023).

2.7.1 Inflamassoma NLRP3

A ativação do complexo inflamassoma é um processo inflamatório, por isso deve

ser altamente controlado (Swanson et al. 2019). Nos dias atuais, a teoria aceita da ativação do NLRP3 inflamassoma é regulada através de duas etapas: (sinal 1) priming, que leva à ativação do fator de transcrição NF- κ B e subsequente transcrição de componentes canônicos e não canônicos do inflamassoma NLRP3; e (sinal 2) ativação, que ocorre quando vários fatores estimulantes, como ATP, toxinas, cristais e micróbios levam à montagem do complexo NLRP3 e subsequente liberação de citocinas inflamatórias (IL-1 β e IL-18) (Ozaki et al. 2015; Yang et al. 2019; Paik et al. 2021; Missiroli et al. 2021).

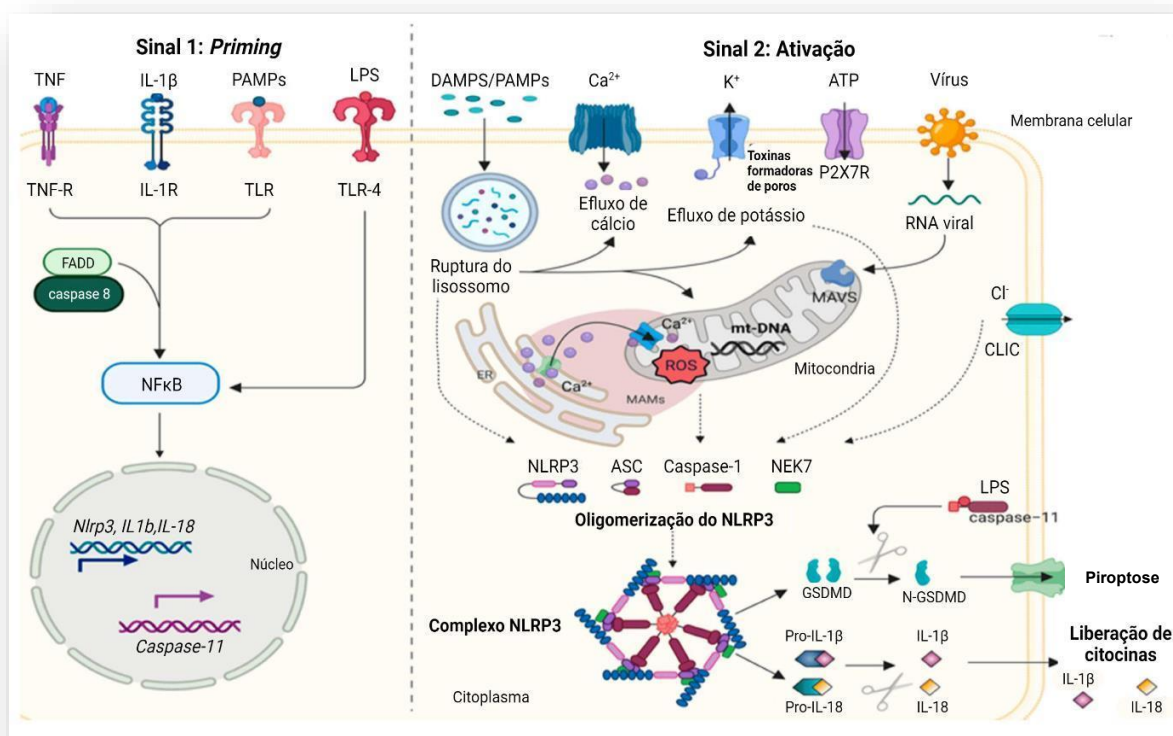
A fase do “*Priming*” tem duas funções (Figura 11). A primeira é regular a expressão dos componentes do inflamassoma *NLRP3*, *caspase-1* e *pró-IL-1 β* (Swanson et al. 2019; Accogli et al. 2023) que ocorre a nível transcricional (Yang et al. 2019; Blevins et al. 2022). Assim, PAMPs e DAMPs são reconhecidos por receptores Toll-like (TLRs) ou proteína contendo domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos 2 (NOD2) (Swanson et al. 2019) ou através de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF) e IL-1 β . Estas citocinas levam à ativação de proteínas e fatores nucleares como a proteína de resposta primária de diferenciação mieloide (MyD88), o fator nuclear kappa-intensificador de cadeia leve de células B ativadas (NF- κ B), a IL-1 β e a proteína ativadora 1 (AP-1) para transcrição gênica e regulação do *NLRP3* e de citocinas pró-inflamatórias (Shao et al. 2015; Missiroli et al. 2021; Blevins et al. 2022).

Além do mais, o *priming* acontece através da ligação do lipopolissacarídeo (LPS) com o TLR4 deslocando o metabolismo dos macrófagos da fosforilação oxidativa para a glicólise, causando indiretamente a estabilização do fator induzível por hipóxia 1 α (HIF1 α) e um aumento na transcrição do gene *IL-1 β* (Swanson et al. 2019). Acrescido a isso, estudos demonstram que a indução da expressão do *NLRP3* durante a fase de *priming* é controlada pela proteína de domínio de morte associada à FAS (FADD) e caspase 8 (Missiroli et al. 2021). As citocinas da família IL-1 também provocam *priming*, muitas vezes no mecanismo de feedback positivo (Yang et al. 2019; Paik et al. 2021; Blevins et al. 2022; Tomasik and Basak 2022).

A teoria do *priming* sobre fatores transcricionais e expressão proteica tem sido amplamente aceita; entretanto, estudos recentes sugerem que o *priming* também controle as modificações pós-traducionais (MPTs) do NLRP3, que estabilizam o NLRP3 em um estado inativo autossuprimido, mas competente em sinal. Múltiplas MPTs foram descritas para NLRP3, incluindo ubiquitilação, fosforilação e sumoilação.

As MPTs do NLRP3 podem ocorrer nas fases não estimulada, *priming*, ativação e resolução, desempenhando um papel importante na regulação da ativação deste complexo por meio de vias dependentes e independentes de transcrição (Swanson et al. 2019; Paik et al. 2021; Blevins et al. 2022). Nessa fase, sabe-se que existem vários estímulos heterogêneos ativadores do NLRP3, embora ainda não esteja claro como moléculas distintas não relacionadas podem ativar o mesmo inflamassoma (Yang et al. 2019; Missiroli et al. 2021).

Figura 11: Priming e ativação do inflamassoma NLRP3. O processo de ativação do inflamassoma NLRP3 requer dois sinais principais: (i) sinal 1 (priming), que leva à ativação do fator de transcrição NF- κ B e à subsequente transcrição dos componentes canônicos e não canônicos do inflamassoma NLRP3; e (ii) sinal 2 (ativação), responsável pela montagem do complexo NLRP3 e posterior liberação de citocinas inflamatórias (IL-1 β e IL-18). CLIC: canal intracelular de cloreto; DAMPs: padrões moleculares associados a danos; FADD: proteína de domínio de morte associada ao Fas; GSDMD: Gasdermina D; IL-18: interleucina-18; IL-1 β : interleucina-1beta; IL-1R: receptor de interleucina 1; LPS: lipopolissacarídeos; MAVS: proteína de sinalização antiviral mitocondrial; mt-DNA: DNA mitocondrial; PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos; ROS: espécies reativas de oxigênio; TLR: Receptor Toll-like.



Fonte: Adaptado de Missiroli et al. (2021, p.4).

A etapa da ativação (sinal 2) (Figura 11) do inflamassoma compreende a oligomerização de NLRP3 e subsequente montagem de NLRP3, ASC e procaspase-1 em um complexo desencadeado por estímulo secundário. O processo acarreta a

transformação da procaspase-1 em caspase-1, bem como a produção e secreção de IL-1 β e IL-18 maduras (Shao et al. 2015; Yang et al. 2019; Tomasik and Basak 2022).

Além da produção de citocinas inflamatórias, a ativação do inflamassoma NLRP3 leva à piroptose, uma forma inflamatória lítica de morte celular programada. Estudos recentes identificaram a gasdermina D (GSDMD) como executor desta morte. A caspase-1 cliva a GSDMD, seus domínios N-terminais se oligomerizam inserindo poros na membrana plasmática acarretando secreção das formas maduras de IL-1 β e IL-18 e a piroptose. A GSDMD também facilita a liberação de IL-1 β e IL-18 via secreção não convencional. Em conjunto, esses achados apontam que a GSDMD define bioquimicamente a piroptose a jusante da ativação do inflamassoma (Yang et al. 2019; Swanson et al. 2019; Paik et al. 2021; Blevins et al. 2022).

Portanto, é interessante notar que não está claro como o NLRP3 consegue detectar esses sinais tão diversos, mas acredita-se que ele reconheça um evento celular comum causado por todos esses estímulos, em vez de se ligar diretamente a cada um deles (Blevins et al. 2022; Hafner-Bratkovič 2023). Embora o inflamassoma NLRP3 seja amplamente estudado, ainda há muitos aspectos desconhecidos. Compreender seus mecanismos específicos de ativação pode ajudar na regulação e identificação de novos alvos terapêuticos (Missiroli et al. 2021). Além disso, o inflamassoma pode servir como biomarcador para avaliar a suscetibilidade e a gravidade de doenças (Tomasik and Basak 2022).

2.8 PAPEL DO NLRP3 NA ANEMIA FALCIFORME

A inflamação e hemólise crônica são condições associadas à AF implicando o potencial envolvimento de inflamassomas em sua patogênese (Tomasik and Basak 2022). Na AF, a ativação do inflamassoma NLRP3 é provavelmente desencadeada pela liberação de produtos da hemólise, como a HGMB1 e o grupo heme, os quais atuam no receptor TLR4 e parecem desempenhar papéis fundamentais na atividade do inflamassoma NLRP3 em células endoteliais, macrófagos e plaquetas (de Freitas Dutra et al. 2022).

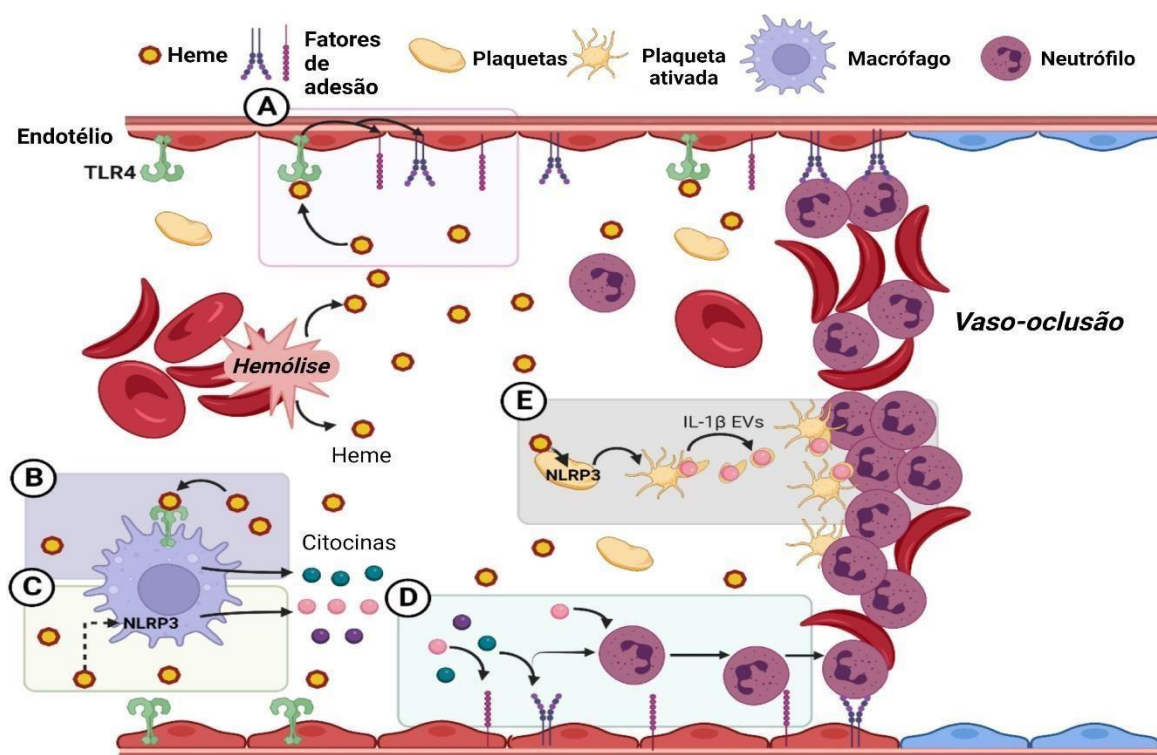
Estudos mostram que altas concentrações de heme livre no plasma estão associadas a um maior risco de complicações clínicas como as crises vaso-oclusivas (CVOs) em crianças e Síndrome Torácica Aguda em pacientes falciformes. Tal evento se desenvolve porque o heme induz a expressão de moléculas de adesão como P-

selectina, VCAM-1 e fator de von Willebrand que favorecem a aderência de células endoteliais, levando ao bloqueio dos vasos sanguíneos. Essa ligação entre células ativadas e células falciformes, plaquetas e neutrófilos contribui para a vaso-oclusão (Erdei et al. 2018; Nyakundi et al. 2019; Shaver et al. 2020; Salgar et al. 2023).

O papel das plaquetas na ativação do inflamassoma parece ser importante, pois a atividade da caspase-1 está elevada nas plaquetas de pacientes falciformes e encontra-se ainda maior nas crises de dor na AF. A ativação de NLRP3 induzida pelo heme também pode promover vaso-oclusão através da sinalização da IL-1 β que promove migração e sobrevivência de neutrófilos (Salgar et al. 2023a). Este complexo proteico foi encontrado regulado positivamente em plaquetas obtidas de pacientes falciformes bem como em modelos murinos. *In vivo*, o bloqueio do inflamassoma pelo MCC950, um inibidor do NLRP3, suprimiu a atividade da caspase-1 e diminuiu a agregação plaquetária. Além disso, a inibição do NLRP3 reduziu o acúmulo de plaquetas no fígado murino. Esses efeitos também foram obtidos pela administração de ibrutinibe, um inibidor de BTK (tirosina quinase de Bruton), sugerindo envolvimento da quinase BTK na regulação do inflamassoma (Salgar et al. 2023a). *In vitro*, a cultura de células mononucleares de sangue periférico - PBMCs (do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) com lisado ou eritrócitos intactos da AF resultou na expressão elevada dos componentes do inflamassoma NLRP3, IL-1 β e IL-18 (Tomasik and Basak 2022) (Figura 12).

Pitanga et al. descobriram que pacientes com DF em estado basal apresentam níveis quatro vezes mais elevados de IL-1 β circulante comparados com indivíduos saudáveis. Além disso, eles observaram expressão elevada dos genes do *NLRP3* e *IL-1 β* nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes falciformes sugerindo a ativação do inflamassoma NLRP3 (Nader et al. 2020).

Figura 12: Mecanismos fisiopatológicos da AF induzidos pelo heme e inflamassoma. (A) Heme desencadeia a sinalização TLR4 levando à ativação de células endoteliais e expressão de moléculas de adesão (B) Heme induz a secreção do fator de necrose tumoral- α (TNF α) em macrófagos através da via de sinalização TLR4, favorecendo a ativação das células endoteliais e a expressão de fatores de adesão. (C) O heme desencadeia a ativação do inflamassoma NLRP3 para produzir as citocinas maduras IL-1 β e IL-18 (círculos rosa e roxo). (D) O recrutamento e ativação de neutrófilos levam à adesão ao endotélio e aos eritrócitos falciformes. (E) A ativação do inflamassoma NLRP3 nas plaquetas leva à geração de vesículas extracelulares (EVs) que carregam IL-1 β , promovendo a geração de agregados plaquetas-neutrófilos.



Fonte: Adaptado de Salgar et al. (2023, p.25).

2.9 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ÓXIDO NÍTRICO (ON) NAS ÚLCERAS MALEOLARES E ANEMIA FALCIFORME

Estudos recentes indicam que pacientes com AF e UMs apresentam níveis elevados da citocina pró-inflamatória IL-8, ressaltando a relevância da inflamação nessas lesões e sugerindo que a IL-8 pode servir como um marcador de mau prognóstico (Domingos et al. 2020a). Além disso, os dados de Nolan e colaboradores sugerem que os fenótipos hemolíticos, como os observados nas UMs, podem ser melhorados por meio de agentes que aumentem a biodisponibilidade do óxido nítrico (ON) ou que reduzam a densidade eritrocitária. A ocorrência de UMs está fortemente associada à intensidade da hemólise (Nolan et al. 2006).

Em 2023, Santos e colaboradores investigaram biomarcadores laboratoriais, parâmetros clínicos e genéticos associados às UMs. Eles identificaram alterações no

metabolismo do ON e na hemólise, associadas à evolução clínica e à gravidade das UMs. Além disso, foram correlacionados biomarcadores hemolíticos laboratoriais com aspectos clínicos e evolução das UMs. Assim como, a hemólise e a anemia foram apontadas como fatores preditivos de tratamentos mal-sucedidos (Santos et al. 2022a). Em 2022, Belisário A. e colaboradores identificaram uma associação entre moléculas inflamatórias, níveis de ON e certos marcadores laboratoriais com a ocorrência de UMs em pacientes com AF. Eles descobriram que as interleucinas IL-8, IL-10 e IL-15, além do ON, estavam associadas às UMs em adultos brasileiros com AF. Esses achados auxiliam na compreensão sobre o mecanismo fisiopatológico das UMs em indivíduos com AF e ajudam na identificação de pacientes em risco, além de sugerirem intervenções terapêuticas para prevenir complicações (Belisário et al. 2022a).

Portanto, os sinais inflamatórios característicos da AF podem, em conjunto, resultar da exposição contínua aos produtos da hemólise (eDAMPs) (Figura 12) (Tomasik and Basak 2022; Salgar et al. 2023a). O complexo inflamassoma NLRP3 e as citocinas inflamatórias desempenham um papel crucial na heterogeneidade clínica das úlceras maleolares na AF. A ativação desse complexo, desencadeada por estímulos como hemácias falciformes e DAMPs, leva à produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-18. Tais citocinas contribuem para o estabelecimento de um estado inflamatório crônico e para a variabilidade fenotípica observada nas úlceras maleolares.

Assim, o inflamassoma NLRP3 e citocinas inflamatórias emergem como alvos estratégicos e inovadores para o desenvolvimento de terapias avançadas e para a identificação de biomarcadores robustos de suscetibilidade e gravidade na anemia falciforme. A elucidação de seu papel pode impulsionar abordagens personalizadas, ampliando as perspectivas para o manejo clínico e prognóstico dessa complicação.

3 CAPÍTULO 1: Inflammatory Cytokine Profile in Patients with Sickle Cell Anemia and Leg Ulcers

Artigo publicado na *British Journal of Haematology*

Qualis Plataforma Sucupira: A1

Fator de impacto: 3.9

RESEARCH LETTER

Inflammatory cytokine profile in patients with sickle cell anaemia and leg ulcers

To the Editor,

Sickle cell anaemia (SCA) is characterised by variable clinical complications, including leg ulcers (LUs). LUs typically develop in areas with reduced subcutaneous tissue, thin skin and impaired blood flow. These lesions are recurrent, heal slowly and currently lack definitive treatments.^{1–3} Their pathological progression is closely associated with chronic intravascular haemolysis and can be influenced by environmental factors, social conditions and genetic predispositions.^{4,5} Recent studies indicate that SCA patients with LUs exhibit elevated levels of inflammatory cytokines, underscoring the role of inflammation in these lesions.^{6,7} In this context, the analysis of serum cytokine levels may provide valuable insights into LUs' pathophysiology as well as potential therapeutic targets.

In the present study, we evaluated the serum levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-18 and tumour necrosis factor- α (TNF- α) in 76 adult SCA patients (homozygous haemoglobin SS genotype), all over 18 years of age, who attended the Haematology and Haemotherapy Centre in Northeast Brazil. Detailed methodological procedures are described in [Data S1](#). According to the clinical history of LU at the time of blood sample collection, patients were stratified into active LU (ALU), healed LU (HLU) and the haemoglobin SS control (Control-HbSS) groups. Detailed clinical and laboratory data are presented in [Table S1](#). Additionally, we included a group of 20 individuals with normal haemoglobin profile (Control-HbAA) for comparison.

We first compared the serum cytokine levels among the LU group, Control-HbSS and Control-HbAA. The LU group consisted of SCA patients with active and healed LU, who were pooled together based on observed similarities in their clinical and laboratory features. LU patients showed higher TNF- α and IL-12p70 compared to both Control-HbSS and Control-HbAA groups. Compared to Control-HbAA, LU patients additionally have elevated IL-6, IL-8, IL-10 and IL-18 ([Figure S1](#)). To determine the influence of hydroxyurea (HU; hydroxycarbamide) therapy on cytokine profiles, LU patients were divided into those receiving HU and those not receiving HU and compared to HU-naïve Control-HbSS. TNF- α remained elevated in LU patients regardless of HU treatment. Moreover, IL-12p70 was higher in LU HU-treated patients compared to HU-naïve HbSS controls, and IL-10

was higher in HU-treated patients compared to both untreated patients and controls ([Figure S2](#)).

Subgroup analysis was conducted to assess cytokine levels among patients with ALU, HLU and Control-HbSS. TNF- α was significantly elevated in ALU ($p=0.0002$) and HLU ($p=0.043$) compared to Control-HbSS. IL-8 was significantly higher in HLU than in Control-HbSS ($p=0.037$). IL-10 levels were elevated in ALU compared to Control-HbSS ($p=0.036$), and IL-12p70 was higher in HLU compared to Control-HbSS ($p=0.0014$). IL-1 β , IL-6 and IL-18 levels did not differ significantly among the three groups ([Figure 1A–G](#)).

To further explore cytokine level patterns among groups, partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was performed. A partial separation between the groups according to the cytokine profile was observed, particularly for the HLU group relative to the Control-HbSS and ALU groups, suggesting that cytokine levels vary subtly according to ulcer status ([Figure 2A](#)). The variable importance in projection (VIP) scores ranked cytokines according to their contribution to group discrimination. TNF- α and IL-8 exhibited the highest VIP scores, indicating their role in distinguishing the clinical groups. IL-1 β and IL-10 also contributed substantially, while IL-18, IL-12p70 and IL-6 displayed lower importance ([Figure 2B](#)).

A correlation analysis was performed to analyse the association between the cytokines and haemolytic markers. In the HbSS control group, IL-1 β was negatively correlated with IL-8 ($p=0.011$). TNF- α exhibited positive correlations with IL-6 ($p=0.011$), IL-8 ($p=0.045$), IL-10 ($p<0.0001$) and IL-12p70 ($p=0.045$). IL-6 was positively correlated with IL-8 ($p=0.002$) and IL-10 ($p<0.001$). IL-12p70 showed a positive correlation with indirect bilirubin (IB) ($p=0.005$) while fetal haemoglobin (HbF) was negatively correlated with IB ($p=0.050$), lactate dehydrogenase (LDH) ($p=0.024$) and reticulocyte count ($p=0.010$) ([Figure 2C](#)). In individuals with HLU, IL-1 β demonstrated significant positive correlations with IL-6 ($p=0.017$) and IL-10 ($p=0.006$). TNF- α was positively correlated with IL-10 ($p=0.012$), and IL-6 showed a significant positive correlation with HbF ($p=0.015$). Haemoglobin levels were inversely correlated with IB ($p=0.032$) ([Figure 2D](#)). Finally, in the ALU group, TNF- α showed a strong positive correlation with IL-12p70

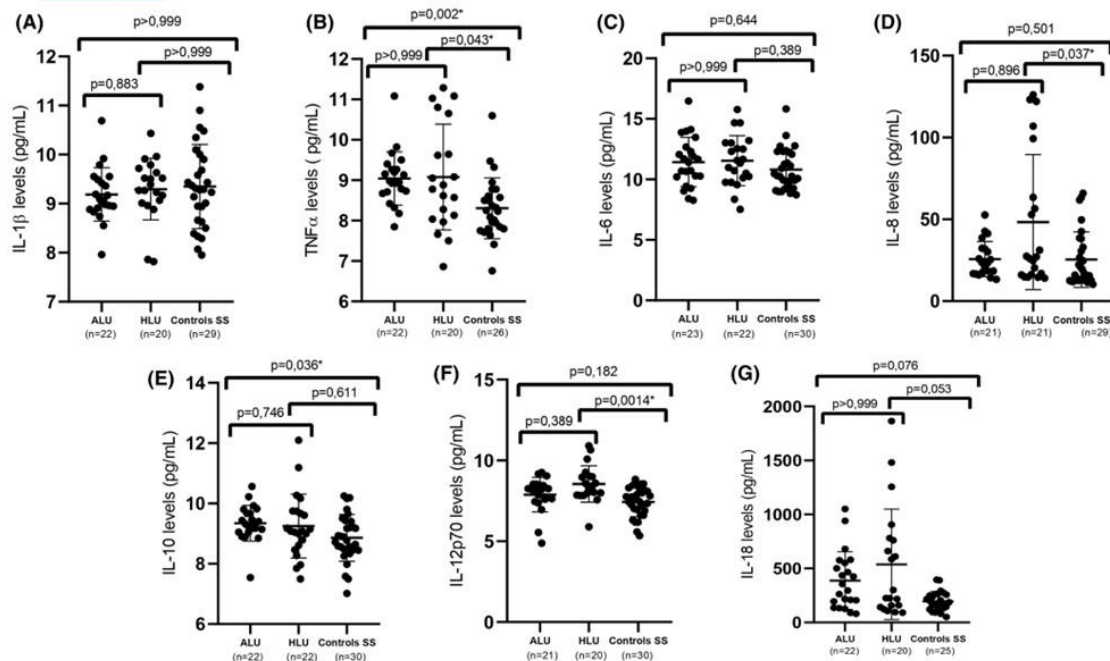


FIGURE 1 Cytokine levels in patients with active leg ulcers (ALU), healed leg ulcers (HLU) and controls with sickle cell anaemia (ControlsHbSS). Serum concentrations of IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C), IL-8 (D), IL-10 (E), IL-12p70 (F) and IL-18 (G) were measured and compared among patients with ALU, HLU and control HbSS. Data are presented as individual values with mean and standard deviation. Statistical comparisons were performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons post-test. Exact p -values are indicated; $^*p < 0.05$ was considered statistically significant. IL, interleukin; TNF- α , tumour necrosis factor- α .

($p=0.002$), and IL-6 was also positively correlated with IL-10 ($p=0.009$). Among haematological markers, IL-18 was negatively correlated with Hb ($p=0.003$) and Hb levels were inversely correlated with LDH ($p=0.004$). Additionally, reticulocyte count showed a positive correlation with IB ($p=0.047$) (Figure 2E).

Our findings revealed a distinct pro-inflammatory pattern in the LU group, suggesting an intensified inflammatory response associated with these lesions. The analysis of inflammatory cytokines revealed significant elevations in TNF- α and IL-12p70 levels in LU patients compared to the control HbSS group. Notably, TNF- α and IL-8 emerged as key discriminators of LU status, as reflected by their high VIP scores in the PLS-DA analysis. These cytokines are well-known mediators of inflammation, tissue injury, wound healing, chronic ulceration and their elevated levels suggest that they may play critical roles in the pathophysiology of LUs in SCA.⁸ TNF- α is a central mediator of inflammation, promoting leucocyte recruitment, endothelial activation and tissue damage, all of which are critical processes in the development and persistence of chronic ulcers.^{5,9} Elevated TNF- α is described to impair angiogenesis and inhibit fibroblast and keratinocyte proliferation and migration in diabetic wounds.¹⁰

Elevated IL-12p70 may contribute to sustained inflammatory signalling in these patients, potentially

exacerbating local tissue injury and impairing wound resolution.⁵ IL-8, as a potent neutrophil chemoattractant and pro-angiogenic factor, is known to contribute to revascularisation and matrix remodelling in healing tissues.^{5,11} High levels of IL-8 in SCA patients with LUs were previously reported.^{6,7} Interestingly, TNF- α , IL-12p70 and IL-8 levels were notably increased in the HLU group compared to the control HbSS group. Its persistent elevation post-healing suggests that these reparative mechanisms may continue beyond visible wound closure, or that underlying subclinical inflammation persists. The persistence of inflammation in HLU patients suggests a chronic inflammatory state that may predispose them to recurrence, highlighting the need for long-term management strategies.

HU, a key therapy in the management of SCA, did not fully alleviate the inflammatory state associated with LUs in this study. Patients with LUs undergoing HU therapy continued to exhibit elevated levels of IL-12p70 and TNF- α compared to the control HbSS group, indicating persistent inflammation despite treatment. The role of HU in modulating inflammation in SCA remains uncertain. A previous study demonstrated that, while HU reduces the expression of the *NLRP3* gene, it does not affect the expression of other key inflammasome-related genes such as *CASP1*, *IL1B* and *IL18*.¹² Moreover, patients with SCA during vaso-occlusive crises still exhibited increased neutrophil extracellular traps

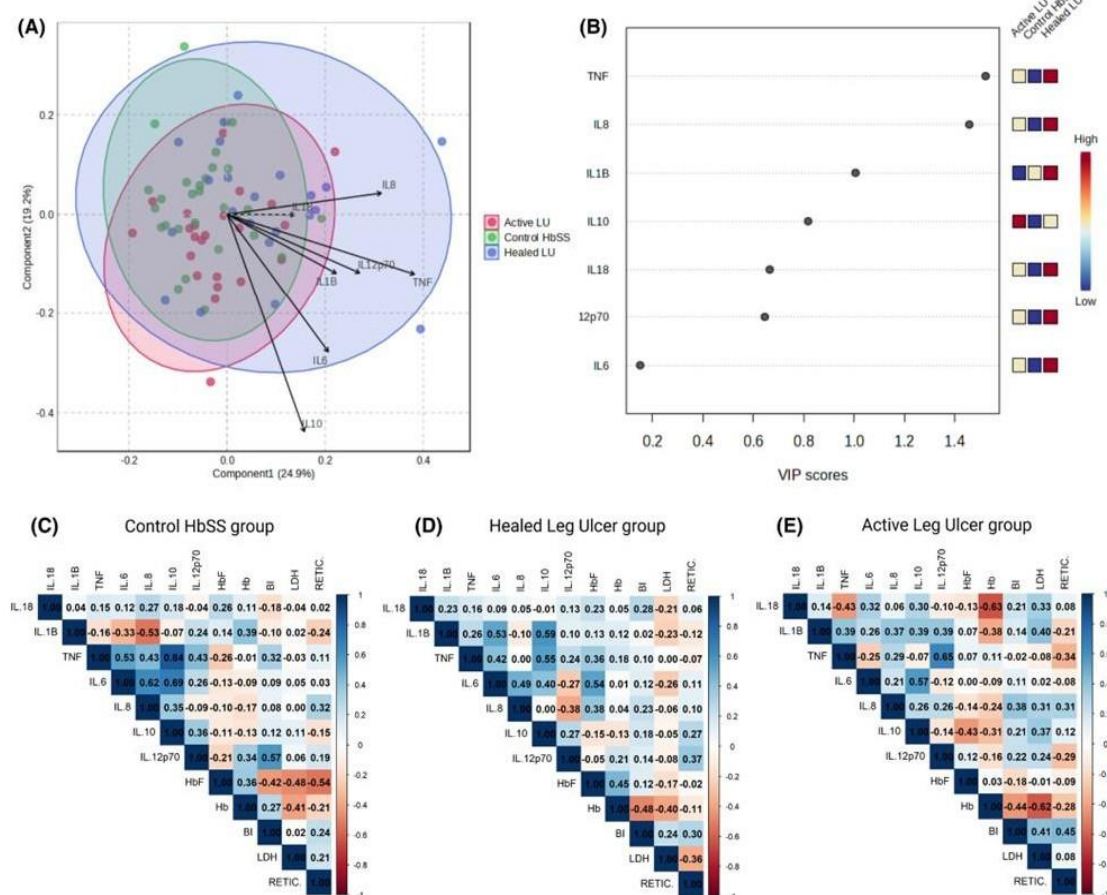


FIGURE 2 Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), variable importance in projection (VIP) scores and Spearman correlation analysis of cytokine profiles. (A) The PLS-DA score plot shows the separation of individuals with active leg ulcers (red), healed leg ulcers (blue) and Control HbSS (green) based on their cytokine profiles. Ellipses represent 95% confidence intervals for each group. (B) VIP scores derived from the PLS-DA model ranked the cytokines according to their importance in differentiating the groups. (C–E) Spearman's correlation coefficients for cytokines (IL-18, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70) and laboratory parameters across study groups. The laboratory parameters include fetal haemoglobin (HbF), haemoglobin concentration (Hb), indirect bilirubin (BI), lactate dehydrogenase (LDH) and reticulocyte count (RETIC) in (C) Control HbSS, (D) healed leg ulcer and (E) active leg ulcer groups. IL, interleukin; TNF, tumour necrosis factor.

formation and a highly proinflammatory profile even during HU treatment.¹³ These data align with our observation that cytokines remain elevated in LU patients on HU therapy, underscoring the complexity of the inflammatory pathways involved in SCA.

The correlation analyses revealed several positive correlations among the cytokines across the groups, suggesting a coordinated pro-inflammatory network. In patients with SCA and ALUs, a negative correlation between IL-18 and Hb concentration, along with the inverse relationship between haemoglobin and LDH, underscores the link between systemic inflammation, haemolysis and impaired oxygen-carrying capacity in patients with active ulcers. Additionally, the positive association between reticulocyte count and bilirubin further supports the presence of enhanced haemolytic

activity in this group. These findings highlight the complex interplay between inflammation and haemolysis in the pathophysiology of leg ulcers in SCA.^{14,15}

Although inflammatory cytokines have been previously studied in SCA-related LUs, our work provides additional insights into the systemic inflammatory environment linked to SCA ulcers through multivariate and correlation analyses. A key strength is the stratification by LU status, allowing a more detailed understanding of inflammatory dynamics across ulcer stages.

We acknowledge some limitations in our study. First, laboratory parameters and cytokine measurements were obtained at different time points, as laboratory data from the exact moment of blood collection were not available. About half of the LU group was on HU therapy. While excluding them would

have substantially reduced the number of eligible patients, their inclusion allowed us to explore the influence of HU on the inflammatory profile of LU patients. Finally, a deeper characterisation of the ulcer microenvironment through sampling of cells at the ulcer site was not feasible, as most patients did not consent to this painful procedure.

In summary, our findings reinforce that LUs in SCA result from a multifactorial interplay between chronic inflammation, haemolysis and impaired wound healing. Elevated levels of cytokines, especially TNF- α , in patients with both active and healed ulcers highlight the persistent inflammatory milieu associated with this complication, even post-clinical resolution. Moreover, the persistent inflammation associated with LUs, even with HU therapy, suggests a limited impact of HU on cytokine-mediated inflammation. Future research should focus on chronic inflammation mechanisms and inflammasome pathways to develop personalised, effective treatments for SCA patients with LUs.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.V.D. performed the experiments, performed the statistical analyses, interpreted the data and drafted the manuscript. A.P.S., B.R.S.B., C.M.L.M., F.O.S., J.V.S.R., G.S.A., H.I.L., M.J.B.M.R., R.C.S. and T.H.C.B. performed the experiments, updated the clinical data and interpreted the data. A.P.S., A.R.L.A., G.S.A. and I.F.D. updated the clinical data and reviewed the manuscript. A.C.M.A., A.P.S., A.S.A., G.S.A., M.A.C.B., M.V.D. and T.H.C.B. recruited the patients, assured access to patients' samples and updated the clinical data. S.T.O.S., F.F.C., A.R.L.A., G.S.A., I.F.D. and M.A.C.B. conceived and designed the study, analysed and interpreted data, and reviewed the manuscript. M.A.C.B. gave the final approval of the version to be submitted.

KEYWORDS

hydroxycarbamide, interleukins, NLRP3, sickle cell disease, skin wounds

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge all patients cooperating in this study. The Article Processing Charge for the publication of this research was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (ROR identifier: 00x0ma614).

FUNDING INFORMATION

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant #405918/2022-4) and (CNPq, Grant #408710/2021-7).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no competing financial interests.

ETHICS STATEMENT

The local research ethics board approved this study (approval number 49177021.8.0000.5208), and following the

Declaration of Helsinki, informed consent was obtained from all participants before the study commencement.

M. V. Diniz¹
A. P. Silva¹
G. S. Arcanjo¹
T. H. C. Batista¹
J. V. S. Rodrigues¹
M. J. B. M. Rêgo²
H. I. Leão²
R. C. Silva²
F. O. Souto³
C. M. L. Melo⁴
B. R. S. Barros⁴
A. C. M. Anjos⁵
A. S. Araújo⁵
I. F. Domingos⁶
S. T. O. Saad⁷
F. F. Costa⁷
A. R. Lucena-Araújo¹
M. A. C. Bezerra¹

¹Genetics Postgraduate Program, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

²Center of Research in Therapeutic Innovation (NUPIT-UFPE), Recife, Brazil

³Aggeu Magalhães Institute/Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Brazil

⁴Laboratory of Immunological and Antitumor Analysis (LAIA), Keiso Asami Institute of Immunopathology (iLIKA-UFPE), Recife, Brazil

⁵Department of Internal Medicine, Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco (HEMOPE), Recife, Brazil

⁶Cardiology Emergency Unity of Pernambuco (PROCAPE), University of Pernambuco, Recife, Brazil

⁷Hematology and Hemotherapy Center, State University of Campinas, São Paulo, Brazil

Correspondence

M. A. C. Bezerra, Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, PE 50670-901, Brazil.
Email: macbezerra.ufpe@gmail.com

ORCID

G. S. Arcanjo <https://orcid.org/0000-0002-1736-0227>

A. S. Araújo <https://orcid.org/0000-0003-1694-8958>

S. T. O. Saad <https://orcid.org/0000-0003-0809-8068>

M. A. C. Bezerra <https://orcid.org/0000-0002-0887-7793>

REFERENCES

1. Minniti CP, Eckman J, Sebastiani P, Steinberg MH, Ballas SK. Leg ulcers in sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2010;85:831–3.
2. Granja PD, Quintão SBM, Perondi F, de Lima RBF, Martins CL d M, Marques MA, et al. Leg ulcers in sickle cell disease patients. *J Vasc Bras*. 2020;19:1–8.

3. Singh AP, Minniti CP. Leg ulceration in sickle cell disease: an early and visible sign of end-organ disease. *Sickle cell disease: Pain and common chronic complications*. London, UK: InTech; 2016. p. 171–202.
4. Alavi A, Kirsner RS. Hemoglobinopathies and leg ulcers. *Int J Low Extrem Wounds*. 2015;14:213–6.
5. Ladizinski B, Bazakas A, Mistry N, Alavi A, Sibbald RG, Salcido R. Sickle cell disease and leg ulcers. *Adv Skin Wound Care*. 2012;25(9):420–8.
6. Domingos IF, Pereira-Martins DA, Sobreira MJVC, Oliveira RTD, Alagbe AE, Lanaro C, et al. High levels of proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8 are associated with a poor clinical outcome in sickle cell anemia. *Ann Hematol*. 2020;99(5):947–53.
7. Belisário AR, Mendes-Oliveira F, de Souza VR, Bolina-Santos E, Mendes FG, Moreno EC, et al. Association between inflammatory molecules, nitric oxide metabolites and leg ulcers in individuals with sickle cell anemia. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2022;44(2):169–76.
8. Ashcroft GS, Jeong MJ, Ashworth JJ, Hardman M, Jin W, Moutsopoulos N, et al. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen*. 2012;20(1):38–49.
9. Conran N, Belcher JD. Inflammation in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018;68(2–3):263–99.
10. Xu F, Zhang C, Graves DT. Abnormal cell responses and role of TNF- α in impaired diabetic wound healing. *Biomed Res Int*. 2013;2013:754802.
11. Matsui C, Koide H, Ikeda T, Ikegami T, Yamamoto T, Escandón JM, et al. Cytokines released from human adipose tissue-derived stem cells by bFGF stimulation: effects of IL-8 and CXCL-1 on wound healing. *Regen Ther*. 2024;26:401–6.
12. Pitanga TN, Santana SS, Zanette DL, Guarda CC, Santiago RP, Maffili VV, et al. Effect of lysed and non-lysed sickle red cells on the activation of NLRP3 inflammasome and LTB4 production by mononuclear cells. *Inflamm Res*. 2021;70(7):823–34.
13. Barbu EA, Mendelsohn L, Samsel L, Thein SL. Pro-inflammatory cytokines associate with NETosis during sickle cell vaso-occlusive crises. *Cytokine*. 2020;127:154933.
14. Santos EC, Santana PVB, de Jesus LLS, Melo GIV, Yahouédéhou SCMA, da Guarda CC, et al. Leg ulcers in sickle cell disease: a multifactorial analysis highlights the hemolytic profile. *Hematol Rep*. 2023;15(1):119–29.
15. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*. 2007;21(1):37–47.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

SUPPLEMENTAL DATA

Inflammatory Cytokine Profile in Patients with Sickle Cell Anaemia and Leg Ulcers

Diniz, M.V.¹, Silva, A.P.¹, Arcanjo, G.S.¹, Batista, T.H.C.¹, Rodrigues, J.V.S.¹, Rêgo, M.J.B.M.², Leão, H.I.², Silva, R.C.², Souto, F.O.³, Melo, C.M.L.⁴, Barros, B.R.S.⁴, Anjos, A.C.M.⁵, Araújo, A.S.⁵, Domingos, I.F.⁶, Saad S.T.O.⁷, Costa, F.F.⁷, Araújo, A.R.L.¹, Bezerra, M.A.C.^{1*}

¹Genetics Postgraduate Program, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

²Center for Research in Therapeutic Innovation – NUPIT – UFPE, Recife, Brazil

³Aggeu Magalhães Institute/Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴Laboratory of Immunological and Antitumor Analysis – LAIA, Keiso Asami Institute of Immunopathology – UFPE, Recife, Brazil

⁵Department of Internal Medicine, Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brazil

⁶Cardiology Emergency Unity of Pernambuco – PROCAPE - UPE, Recife, Brazil

⁷Hematology and Hemotherapy Center, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

***Corresponding Author:** Marcos A C Bezerra. Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, PE 50670-901, Brazil. Tel: +55(81)2126-7825. Fax: +55(81)2126-7825

Email: macbezerra.ufpe@gmail.com

METHODS

Patients

Between March 2022 and February 2024, peripheral blood samples were collected from 76 individuals with SCA, all over 18 years of age, who were regularly monitored by a reference blood centre in Northeast Brazil. All patients were randomly recruited during routine medical visits. Patients receiving chronic blood transfusions, as well as those hospitalised for acute vaso-occlusive crises or related complications within the three months before blood collection, were excluded from the study. Based on the status of LUs, patients were classified into active LU (ALU), which included 23 SCA patients with ALU at the time of sample collection, and the healed LU (HLU), which included 22 SCA patients with previously diagnosed LUs that were fully healed by the time of sampling. At the time of blood sample collection, 55.6% (25/45) of patients with LUs were undergoing hydroxyurea (HU) therapy. Patients receiving HU therapy had been in treatment for at least one year at the maximum tolerated dose, ranging from 30 to 35 mg/kg/day.

The Control-HbSS consisted of 31 SCA patients with no history of LU, either before or during the study period. These individuals were not undergoing HU therapy due to unsatisfactory clinical response or personal reasons, such as procreation-related concerns, side effects, or drug intolerance. The Control-HbAA group consisted of 20 Afro-descendant blood donors recruited from the reference blood centre, with a normal haemoglobin profile (HbAA) confirmed by haemoglobin electrophoresis. These individuals had no history of diabetes or dermatological conditions such as ulcers, skin wounds, psoriasis, or atopic eczema at the time of sample collection. They also had no autoimmune diseases and were not experiencing any infectious processes during sample collection.

Clinical and baseline laboratory data (foetal haemoglobin levels, hematologic profile, and biochemical parameters) were obtained retrospectively from medical records. For patients under HU therapy, the laboratory data were obtained specifically from treatment-free periods. Homozygosity for haemoglobin S (HbSS) was confirmed in all SCA patients using high-performance liquid chromatography (HPLC) on the Variant II Turbo™ system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The Gap-PCR technique was used to determine the coinheritance with ^{-3.7Kb} alpha-thalassaemia deletion [1]. The β^S-globin gene cluster haplotypes were also determined as previously described [2]. The

study was approved by the local research ethics committee (approval number 49177021.8.0000.5208), and written informed consent was obtained from all participants prior to their inclusion in the study.

Detection of serum levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-18 and TNF α

At the time of patients' recruitment, samples were collected in tubes without anticoagulant, subsequently centrifuged at 1,000g for 15 minutes, and the serum was stored at -80°C. The inflammatory cytokine IL-18 was measured using a commercial ELISA kit (Quantikine ELISA Kits, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and TNF α were measured from serum samples using flow cytometry with a commercial human inflammatory cytokine kit (BD™ Cytometric Bead Array – CBA – Human Inflammatory Cytokines Kit, Becton, Dickinson and Company. © 2008 BD).

Statistical analysis

Patient baseline characteristics were reported descriptively. Fisher's exact test or chi-square test, as appropriate, was used to compare categorical variables. Continuous variables were expressed as median and were compared using the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparisons post-test. To explore associations between cytokine levels and clinical or haematological parameters, Spearman correlation analysis was conducted within each group (Active LU, Healed LU, and Control HbSS). Correlation coefficients (r) and corresponding p -values were used to assess the strength and significance of relationships, with a significance threshold set at $p < 0.05$.

Multivariate analysis was performed using Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) to identify cytokine profiles that best distinguished among the clinical groups. Variable Importance in Projection (VIP) scores were calculated to rank cytokines based on their contribution to group separation. These analyses were conducted using MetaboAnalyst 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>). All statistical analyses were performed using SPSS Statistics 19.0 (IBM Corporation, Somers, NY, USA), GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and R software.

COMPLEMENTARY RESULTS

Patients' description

In the cohort, the median age was 36 years (range: 18–60), with 50% of participants being female. Out of the 76 SCA patients, 23 patients (30,3%) presented active LU, followed by 22 (28,9%) with healed LU and 31 patients (40,8%) with no clinical history of LU development. Haemoglobin F (HbF) levels ($p = 0.004$) and total haemoglobin (Hb) levels ($p = 0.014$) were significantly lower in the ALU group compared to others. A total of 52.7% of individuals had the β^S -globin CAR-CAR haplotype. No significant association was found between the α -thalassemia -3.7kb mutation ($\alpha\alpha/-\alpha$ or $-\alpha/-\alpha$) or β^S -globin haplotypes with LUs ($p > 0.05$). During the study recruitment, 55.6% (25/45) of patients with LUs were undergoing hydroxyurea (HU) therapy. Detailed clinical and laboratory data are presented in Table S1. The group control-HbAA was composed of 20 individuals with a median age of 36 years (range: 22-52, 50% males).

Cytokine levels in patients with leg ulcers versus controls

To investigate the inflammatory profile associated with LU in SCA patients, we first compared the serum levels of the cytokines among three groups: LU group (ALU and HLU), Control SS and Control AA (Figure S1 A-G). TNF- α levels (Figure S1B) were significantly elevated in the LU group compared to both Control SS ($p = 0.020$) and Control AA ($p = 0.0001$). IL-12p70 levels (Figure S1F) were significantly higher in the LU group compared to both Control SS ($p = 0.007$) and Control AA ($p = 0.0001$). IL-6 levels (Figure S1C) were also significantly increased in the LU group when compared to the Control AA ($p < 0.0001$), and the Control SS group exhibited higher IL-6 levels than those in the Control AA group ($p = 0.003$). Regarding IL-8 (Figure 1D), patients in the LU group displayed significantly higher levels compared to Control AA ($p = 0.0002$), although the differences between LU and Control SS were observed. IL-10 levels (Figure S1E) were significantly higher in LU patients compared to Control AA ($p = 0.035$). IL-18 levels (Figure S1G) were significantly elevated in the LU group compared to Control AA ($p < 0.0001$), while the differences between LU and Control SS and between Control SS and Control AA did not reach statistical significance. Finally, no significant differences in IL-1 β levels (Figure S1A) were observed among the three groups.

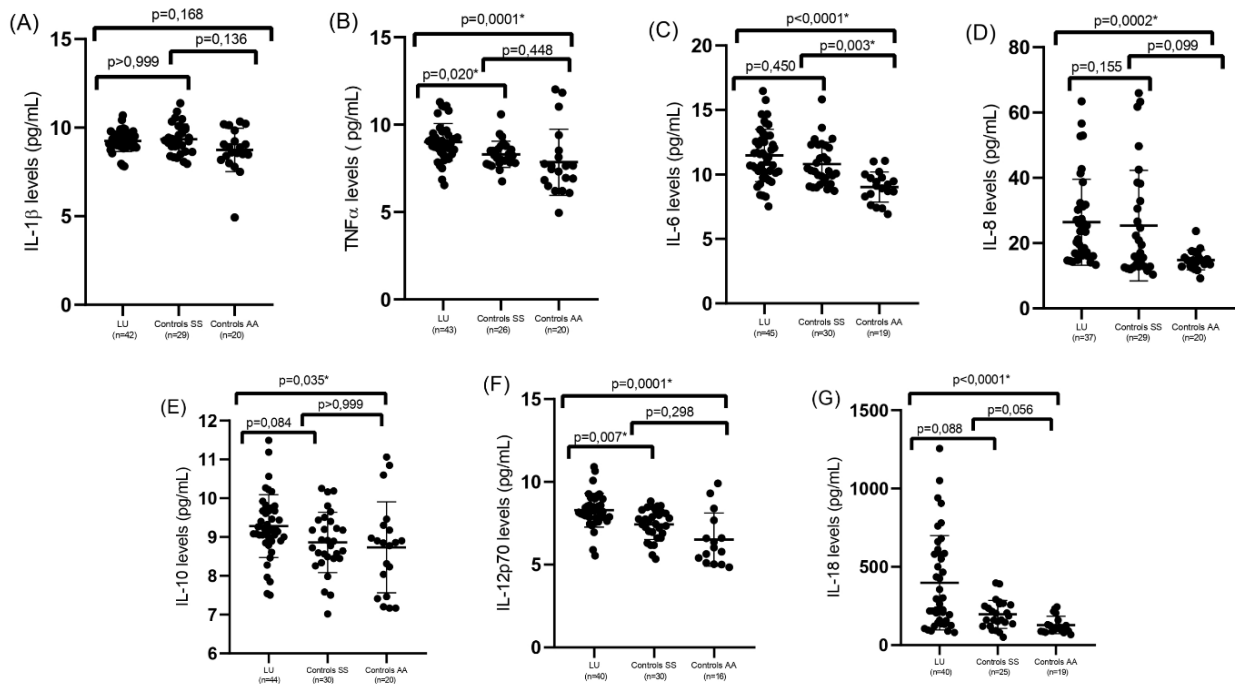


Fig. S1: Cytokine levels in patients with leg ulcers (LU) compared to control groups. Serum concentrations of IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C), IL-8 (D), IL-10 (E), IL-12p70 (F) and IL-18 (G) were measured and compared among patients with leg ulcers (LU), sickle cell anaemia controls without leg ulcers (Controls HbSS), and healthy controls with normal haemoglobin genotype (Controls HbAA). Data are presented as individual values with mean and standard deviation. Statistical comparisons were performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons post-test. Exact p-values are indicated; *p < 0.05 was considered statistically significant.

Cytokine levels in LU patients (HU+ and HU-) versus controls SS

To determine the influence of HU therapy on cytokine profiles, LU patients were divided into those receiving HU (HU+) and those not receiving HU (HU-) and compared to HU-naive Control SS (Figure S2 A-G). Cytokine profiling revealed that LU patients, regardless of HU use, maintained elevated TNF- α and IL-12p70 levels compared to HU-naive HbSS controls, indicating persistent inflammation independent of HU therapy. Moreover, HU-treated patients exhibited higher IL-12p70 levels compared to HU-naive HbSS controls. HU-treated patients showed significantly higher levels of IL-10 compared to both untreated patients and controls. No significant HU-related differences were observed for IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-18.

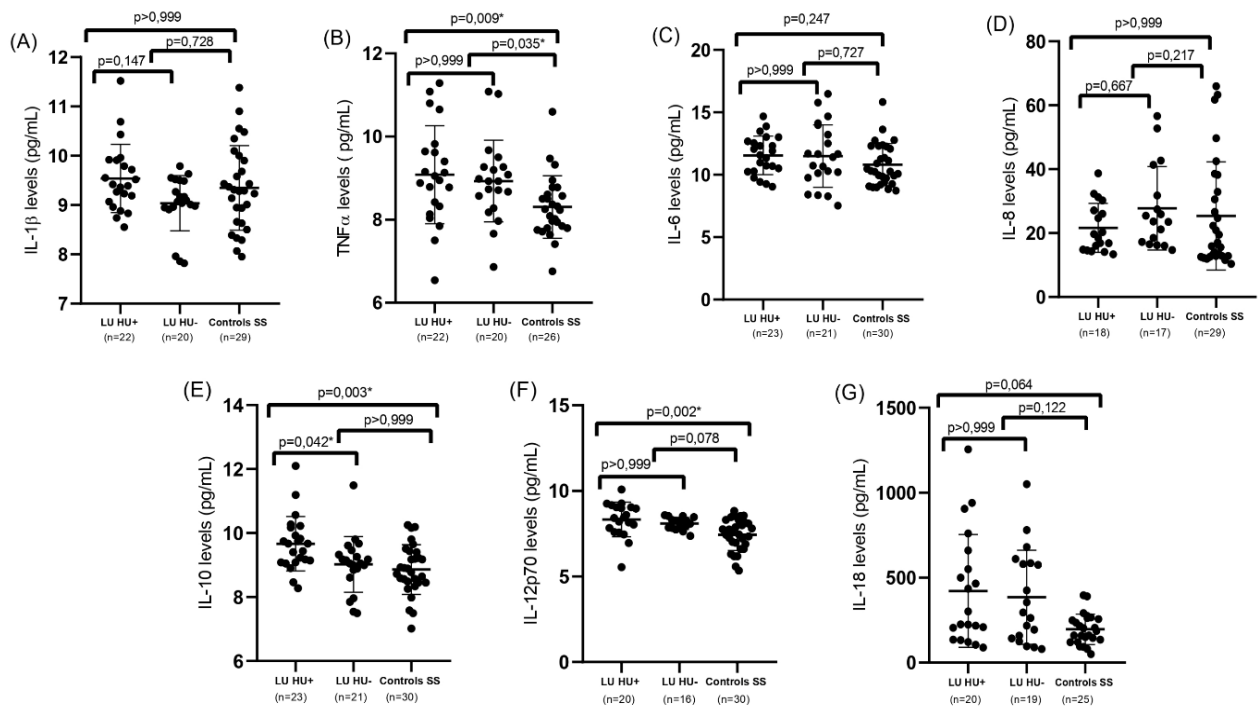


Fig. S2: Effect of hydroxyurea (HU) therapy on cytokine profiles in patients with leg ulcers (LU). Patients with LU were stratified based on hydroxyurea treatment status into HU-treated (LU HU+) and non-treated (LU HU-) groups and compared to hydroxyurea-naïve sickle cell anaemia controls (Controls SS). Serum levels of IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C), IL-8 (D), IL-10 (E), IL-12p70 (F) and IL-18 (G) were assessed. Data are presented as individual values with mean and standard deviation. Statistical comparisons were performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons post-test. Exact p-values are indicated; *p < 0.05 was considered statistically significant.

SUPPLEMENTAL TABLE

Table S1. Baseline clinical and laboratory features of SCA patients according to the LU status.

| Characteristics of patients | All patients (n = 76) | | Active LU (n = 23) | | Healed LU (n = 22) | | Controls HbSS (n=31) | | P-value* |
|---|-----------------------|------|--------------------|------|--------------------|------|----------------------|------|----------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | |
| Sex | | | | | | | | | |
| Female | 38 | 50 | 11 | 47,8 | 12 | 54,5 | 15 | 48,4 | 0,879 |
| Male | 38 | 50 | 12 | 52,2 | 10 | 45,5 | 16 | 51,6 | |
| Age (years) Median | 36 | | 40 | | 37 | | 31 | | 0,023* |
| Range | 18-60 | | 24-60 | | 19-57 | | 18-49 | | |
| VOCs/ <i>per year</i> | | | | | | | | | |
| Missing data | 4 | 5,3 | 0 | 0 | 1 | 4,5 | 3 | 9,7 | 0,508 |
| <3 | 34 | 44,6 | 9 | 39,1 | 9 | 40,9 | 16 | 51,6 | |
| 3 - 6 | 25 | 8,0 | 8 | 34,8 | 8 | 36,4 | 9 | 29,0 | |
| >6 | 13 | 6,0 | 6 | 26,1 | 4 | 18,2 | 3 | 9,7 | |
| Hb (g/dL) median | 7,8 | | 7,0 | | 7,6 | | 8,5 | | 0,014* |
| Hb F (%) median | 5,8 | | 4,0 | | 8,0 | | 7,2 | | 0,004* |
| Reticulocyte (%) median | 9,2 | | 9,3 | | 8,4 | | 9,3 | | 0,944 |
| WBC (x 10 ⁹ /L) median | 11590 | | 12200 | | 10500 | | 11500 | | 0,615 |
| Platelets (x 10 ⁹ /L) median | 402000 | | 371500 | | 402000 | | 452000 | | 0,565 |
| TB (mg/dL) median | 3,11 | | 3,21 | | 3,56 | | 2,95 | | 0,302 |
| IB (mg/dL) median | 2,30 | | 2,08 | | 2,85 | | 2,28 | | 0,482 |
| LDH (U/L) median | 753 | | 938,5 | | 822,5 | | 544 | | 0,119 |
| Hydroxyurea therapy | | | | | | | | | |
| Missing data | 3 | 3,9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 9,7 | <0,0001* |
| Yes | 25 | 32,9 | 12 | 52,2 | 13 | 59,1 | 0 | 0 | |
| No | 48 | 63,2 | 11 | 47,8 | 9 | 40,9 | 28 | 90,3 | |
| β ^S haplotype | | | | | | | | | |
| Missing data | 9 | 11,8 | 2 | 8,7 | 2 | 9,1 | 5 | 6,1 | 0,244 |
| CAR/CAR | 40 | 52,7 | 13 | 56,5 | 9 | 40,9 | 18 | 8,1 | |
| Non-CAR/CAR | 27 | 35,3 | 8 | 34,8 | 11 | 50,0 | 8 | 5,8 | |
| α-thalassemia (α ^{-3.7kb}) | | | | | | | | | |
| Missing data | 7 | 9,2 | 2 | 8,7 | 2 | 9,1 | 3 | 9,7 | 0,808 |
| Mutated | 15 | 19,7 | 11 | 21,7 | 9 | 22,7 | 5 | 16,1 | |
| Non-mutated | 54 | 71,1 | 12 | 69,6 | 13 | 68,2 | 23 | 74,2 | |

VOC, vaso-occlusive crisis; RBC, red blood cell; Hb, haemoglobin; Hb F, foetal haemoglobin; WBC, white blood cells; TB, total bilirubin; IB, indirect bilirubin; LDH, lactate dehydrogenase; CAR, Central African Republic. Laboratory parameters are described as median. Mutated alpha thalassemia are defined by one or two deletional α genes.

* Statistically significant difference (p < 0.05).

REFERENCES

1. Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J. Rapid analysis of $-\alpha$ 3.7 thalassaemia and $\alpha\alpha$ anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol*. 1992 Jan;82(1):105–11.
2. Powars DR. Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1991 Jun;5(3):475–93.

4 CAPÍTULO 2: Leg ulcers in sickle cell anemia are associated with reduced *IL-18* expression and inflammasome imbalance

Leg ulcers in sickle cell anemia are associated with reduced *IL18* expression and inflammasome imbalance

Diniz, M.V.¹, Silva, A.P.¹, Arcanjo, G.S.¹, Batista, T.H.C.¹, Rodrigues, J.V.S.¹, Galisa, S.L.G.², Vasconcelos, L.R.S.², Anjos, A.C.M.³, Araújo, A.S.³, Domingos, I.F.⁴, Saad S.T.O.⁵, Costa, F.F.⁵, Araújo, A.R.L.¹, Bezerra, M.A.C.^{1*}

¹Genetics Postgraduate Program, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

²Aggeu Magalhães Institute/Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil

³Department of Internal Medicine, Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brazil

⁴Cardiology Emergency Unit of Pernambuco – PROCAPE - UPE, Recife, Brazil

⁵Hematology and Hemotherapy Center, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

*Corresponding Author: Marcos A C Bezerra. Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, PE 50670-901, Brazil. Tel: +55(81)2126-7825. Fax: +55(81)2126-7825
Email: macbezerra.ufpe@gmail.com

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is characterized by chronic inflammation and variable clinical manifestations, including leg ulcers (LUs). The NLRP3 inflammasome exerts a key role in inflammation by promoting the maturation and secretion of IL-1 β and IL-18. However, its participation in the pathophysiology of SCA-related LUs remains unclear. Here, we evaluated the expression levels of *IL18*, *IL1B*, *CASP1*, and *NLRP3* genes in 96 adults, including 23 with SCA and active LUs (ALU), 22 with SCA and healed LUs (HLU), 31 with SCA without LUs (Control-HbSS), and 20 individuals without SCA and LUs (Control-HbAA). *CASP1* expression was significantly higher in the HLU group compared with HbAA controls ($p = 0.001$; fold change [FC] = 3.04). *NLRP3* expression was significantly elevated in the HLU ($p < 0.001$; FC = 3.33) and ALU group compared to HbAA controls ($p = 0.001$; FC = 2.80). A significant downregulation of *IL18* expression was observed in both ALU ($p = 0.002$; FC = -2.82) and HLU ($p = 0.004$; FC = -2.54) groups compared with Control-HbSS. No significant differences were detected for *IL1B*, *CASP1*, or *NLRP3* ($p > 0.05$). When the analysis was stratified by hydroxyurea (HU) treatment, *IL18* expression remained significantly reduced in LU patients regardless of therapy, indicating that HU does not appear to modulate *IL18* transcription in this context. Collectively, our results highlight a potential dysregulation of IL-18-mediated signaling in the chronic inflammatory environment of SCA-related LUs, providing new insights into mechanisms contributing to impaired wound healing in this complication.

Keywords: Interleukins; Hydroxyurea; NLRP3; Sickle Cell Disease; Skin wounds.

INTRODUCTION

The pathophysiology of sickle cell anemia (SCA) is driven by the formation of hemoglobin S (HbS), which, under conditions such as hypoxia, decreased pH and low fetal hemoglobin (HbF) levels, undergoes polymerization, causing erythrocytes to assume a sickled shape [1]. These altered cells contribute to vaso-occlusion and tissue ischemia, triggering a cascade of pathological events, including hemolysis, endothelial dysfunction, inflammation, hypercoagulability and oxidative stress [2,3].

Among the many clinical manifestations of SCA are leg ulcers (LUs), which typically develop in regions with reduced subcutaneous tissue, thin skin and impaired blood flow. LUs are recurrent, slow to heal, and currently lack definitive treatments [4–6]. Their pathological progression is associated with chronic hemolysis and is influenced by environmental, social and genetic factors [7,8].

Chronic hemolysis in SCA results in the release of free hemoglobin, which is subsequently oxidized to liberate heme, an important damage-associated molecular pattern (DAMP) [9]. Heme promotes the generation of reactive oxygen species, activates Toll-like receptor 4 (TLR4) and Nod-like receptors, and triggers the release of additional DAMPs [10]. Activated Nod-like receptors form the inflammasome, a cytoplasmic multiprotein damage-recognition complex that typically includes NLRP3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3), the adaptor protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein), and caspase-1, an inflammatory protease [11,12]. Caspase-1 activation drives the production of key pro-inflammatory cytokines, including IL-1 β and IL-18 [10,13].

Previous studies have demonstrated that SS erythrocytes can act as DAMPs, as evidenced by the induction of inflammasome component expression in stimulated PBMCs, underscoring the NLRP3 inflammasome as a key inflammatory pathway associated with the clinical inflammatory state in SCA [14]. Additionally, SCA patients receiving hydroxyurea (HU) exhibit distinct gene expression profiles and inflammatory mediator production compared to untreated patients [14]. Furthermore, oxidized forms of hemoglobin (ferrylHb) act as potent pro-inflammatory molecules capable of inducing the formation and maturation of IL-1 β in vitro and in vivo. This inflammatory response is driven by activation of the NLRP3 inflammasome and caspase-1 [15]. Collectively, these findings indicate that hemolysis in SCA is closely linked to NLRP3 inflammasome

activation, contributing to chronic inflammation.

Recent studies have shown that SCA patients with LUs exhibit elevated levels of the cytokines IL-8, IL-10 and IL-15, reinforcing the central role of inflammation in the development of these lesions [16,17]. These findings highlight the importance of inflammatory pathways in SCA-related complications and support the need for therapeutic strategies to reduce risk and prevent further morbidity [16].

Given the high prevalence, frequent recurrence, and lack of effective treatment for LUs in SCA patients, further investigation is warranted to elucidate the relationship between the NLRP3 inflammasome and SCA-associated LUs. In this context, analyzing the expression of *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B* and *IL18* genes may yield valuable insights into the factors influencing the pathogenesis and treatment of LUs.

METHODS

Patients

Between March 2022 and February 2024, peripheral blood samples were collected from 76 individuals with SCA, all over 18 years of age, who were regularly monitored by a reference blood center in Northeast Brazil. All patients were randomly recruited during routine medical visits. Patients receiving chronic blood transfusions, as well as those hospitalized for acute vaso-occlusive crises or related complications within the three months before blood collection, were excluded from the study. Patients who presented other main clinical complications of SCA, such as osteonecrosis, stroke, priapism, and acute chest syndrome, were not included.

Based on the status of LUs, patients were classified into active LU (ALU), which included 23 SCA patients with ALU at the time of sample collection, and the healed LU (HLU), which included 22 SCA patients with previously diagnosed LUs that were fully healed by the time of sampling. At the time of blood sample collection, 55.6% (25/45) of patients with LUs were undergoing HU therapy. Patients receiving HU therapy had been in treatment for at least one year at the maximum tolerated dose, ranging from 30 to 35 mg/kg/day.

The Control-HbSS consisted of 31 SCA patients with no history of LU, either before or during the study period. These individuals were not undergoing HU therapy due to unsatisfactory clinical response or personal reasons, such as procreation-

related concerns, side effects or drug intolerance. The Control-HbAA group consisted of 20 Afro-descendant blood donors recruited from the reference blood center, with a normal hemoglobin profile (HbAA) confirmed by hemoglobin electrophoresis. These individuals had no history of diabetes or dermatological conditions such as ulcers, skin wounds, psoriasis, or atopic eczema at the time of sample collection. They also had no autoimmune diseases and were not experiencing any infectious processes during sample collection.

Clinical and baseline laboratory data (fetal hemoglobin levels, hematologic profile, and biochemical parameters) were obtained retrospectively from medical records. For patients under HU therapy, the laboratory data was obtained specifically from treatment-free periods. Homozygosity for hemoglobin S (HbSS) was confirmed in all SCA patients using high-performance liquid chromatography (HPLC) on the Variant II Turbo™ system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The Gap-PCR technique was used to determine the coinheritance with ^{-3.7Kb} alpha-thalassemia deletion [18]. The β^S-globin gene cluster haplotypes were also determined as previously described [19]. The study was approved by the local research ethics committee (approval number 49177021.8.0000.5208), and written informed consent was obtained from all participants prior to their inclusion in the study.

Total RNA extraction and real-time qPCR

Total RNA was extracted from 4 mL of peripheral blood leukocytes collected in an EDTA-vacutainer using the Trizol® reagent (Invitrogen, USA). Subsequently, the extracted samples were quantified on a NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Rockland, DE). Reverse transcription was performed using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems™, USA), following the manufacturer's protocol. After cDNA synthesis, quantitative real-time PCR reactions were performed in triplicate on 96-well MicroAmp optical plates, on a QuantStudio 5 Real-Time PCR equipment (Applied Biosystems™, USA), using TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems™, USA), according to manufacturer recommendations. Each reaction had 20 µL of final volume, containing 2x Master Mix Universal TaqMan, cDNA sample, specific probe (*NLRP3* - Assay ID: Hs00918082; *CASP1* - Assay ID: Hs00354836, *IL1B* - Assay ID: Hs01555410, and *IL18* - Assay ID: Hs01038788, Applied Biosystems™, USA), and nuclease-free water. The *GAPDH*

gene (#4333764T, Applied Biosystems) was used as an endogenous control gene to normalize the results. Relative gene expression was quantified using the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method.

Statistical analysis

Patient baseline characteristics were reported descriptively. Fisher's exact test or chi-square test, when appropriate, was used to compare the categorical variables. Continuous variables were expressed as median and were compared by the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparisons post-test. All *P* values were two-sided with a significance level of 0.05. All statistical analyses were performed using SPSS Statistics 19.0 (IBM Corporation, Somers, NY, USA), GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and R software.

RESULTS

Patients' description

In the cohort, the median age was 36 years (range: 18–60), with 50% of participants being female. Out of the 76 SCA patients, 23 patients (30,3%) presented active LU, followed by 22 (28,9%) with healed LU and 31 patients (40,8%) with no clinical history of LU development. Haemoglobin F (HbF) levels ($p = 0.004$) and total haemoglobin (Hb) levels ($p = 0.014$) were significantly lower in the ALU group compared to others. A total of 52.7% of individuals had the β^S -globin CAR-CAR haplotype. No significant association was found between the α -thalassemia ^{-3.7kb} mutation ($\alpha\alpha/-\alpha$ or $-\alpha/-\alpha$) or β^S -globin haplotypes with LUs ($p > 0.05$). During the study recruitment, 55.6% (25/45) of patients with LUs were undergoing HU therapy. Detailed clinical and laboratory data are presented in Table 1. The control-HbAA group was composed of 20 individuals with a median age of 36 years (range: 22-52, 50% males).

Differential expression analysis of the NLRP3 inflammasome gene pathway

We compared the expression of inflammasome-related genes among patients with ALU, HLU, and hemoglobin AA controls (HbAA) (Supplementary Figure 1). *CASP1* expression was significantly higher in the HLU group compared with HbAA controls ($p = 0.001$; fold change [FC] = 3.04) (Figure S1C). Similarly, *NLRP3* expression was

significantly elevated in the HLU group compared to HbAA controls ($p < 0.001$; FC = 3.33) and ALU compared to HbAA controls ($p = 0.001$; FC = 2.80) (Figure S1D). No significant differences were observed in *IL18* (Figure S1A) or *IL1B* (Figure S1B) expression among the groups ($p > 0.9$).

To examine the differential expression of *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B* and *IL18* genes between patients with SCA with and without leg ulcers, we conducted comparative analyses using patients with SCA without ulcers (Control-HbSS) as the control group. Among all subjects analysed, significant downregulation of *IL18* was observed in patients with ALU ($p = 0.002$; FC = -2.82) and HLU ($p = 0.004$; FC = -2.54) compared with the Control-HbSS group. No significant differences were observed in the expression levels of the other genes studied ($p > 0.05$) (Figure 1).

Moreover, to evaluate the impact of HU therapy on the expression levels of the analysed genes, we first conducted the same analysis with only LU patients who did not receive HU therapy. A significant reduction in *IL18* expression was detected in HLU patients compared with the Control-HbSS group ($p = 0.006$; FC = -3.38). No additional differences were observed for the other genes (Supplementary Figure 2). Finally, the same analysis was conducted, including only LU patients under HU therapy. Similarly, *IL18* expression remained significantly downregulated in ALU patients ($p < 0.001$; FC = -4.53) and in HLU patients ($p = 0.004$; FC = -2.26), relative to SS controls. No significant alterations were observed in the expression of the other genes (Supplementary Figure 3).

DISCUSSION

LUs are a debilitating complication of SCA, linked to inflammation and poor wound healing. These lesions result from a combination of chronic hemolysis, ischemic, inflammatory and microcirculation deficiencies, triggering chronic pain, increased infection risk and reduced quality of life [6,20–22]. To further explore the physiopathology of LUs, we investigated the expression of inflammasome-related genes in patients with SCA and LUs. Our findings reveal distinct patterns of inflammasome gene expression associated with LUs status, highlighting potential molecular mechanisms underlying the chronic inflammation of these lesions.

In our study, patients with LUs exhibited lower levels of HbF and total Hb,

highlighting the protective role of HbF in mitigating hemolysis and inflammation. The significantly lower levels of HbF in the ALU group support the hypothesis that reduced HbF exacerbates the pathophysiology of LUs by intensifying hemolysis-associated inflammation [1]. This aligns with previous observations that highlighted the protective effect of higher HbF levels against the development of LUs, underscoring the critical role of HbF in reducing disease-associated clinical complications [23].

Although the evaluation of serum cytokines, hemolytic markers and expression of specific microRNA has been investigated in the context of SCA LUs, the analysis of inflammasome-related genes remained unexplored [17, 24–27]. Here, *IL18* expression was consistently downregulated in both ALU and HLU groups compared with SCA controls without ulcers. This reduction contrasts with the classical paradigm of IL-18 as a pro-inflammatory cytokine [28]. In patients with diabetic foot ulcers, a complication that shares some pathophysiological similarities with the SCA LUs, high levels of IL-18 cytokine and *IL18* gene expression were observed [29,30].

One possible explanation for this discrepancy is that local regulatory mechanisms at the ulcer site or systemic feedback loops may suppress *IL18* transcription to prevent exacerbation of inflammation. Alternatively, chronic exposure to inflammatory stimuli in SCA could induce a state of immune tolerance or dysregulation, resulting in impaired *IL18* gene expression. This observation aligns with reports suggesting that IL-18 activity is highly context-dependent, exhibiting pleiotropic properties depending on the cytokine milieu, cellular environment and disease stage [31,32]. In agreement, it was demonstrated that IL-18 mediates distinct inflammatory pathways, promoting either a Th1 or Th2 response in various dermatologic diseases [28]. These findings reinforce that IL-18 signaling is influenced by the inflammatory microenvironment, which may help explain the reduced *IL18* gene expression observed in SCA LUs despite the chronic inflammatory background of the disease.

The participation of IL-18 in wound healing has also been proposed [33]. Early studies demonstrated that IL-18 expression is rapidly and strongly induced after tissue injury, particularly in keratinocytes, suggesting a pivotal role during the initial phase of repair [34]. Interestingly, this early rise in IL-18 protein levels occurs concomitantly with a decline in its mRNA expression [34,35]. More recent evidence showed that IL-18 promotes epithelial cell differentiation, metabolic activity, and wound repair, highlighting its importance in tissue regeneration [36]. In infectious skin models, IL-18 deficiency exacerbates ulcer formation and inflammation, reinforcing its protective and

regulatory role during cutaneous injury through IFN- γ -mediated immune responses [37]. Collectively, these findings indicate that IL-18 contributes to maintaining the balance between inflammation and tissue repair, being required for wound healing. Therefore, it might be hypothesized that the reduced *IL18* gene expression observed in SCA patients with LUs may reflect a failure to adequately initiate or sustain IL-18-mediated reparative signaling, potentially contributing to the chronic and non-healing nature of these lesions.

Interestingly, no significant alterations were detected in *IL1B*, *CASP1*, and *NLRP3* expression when comparing the LU groups and SCA controls. Although IL-1 β is a key effector cytokine of the NLRP3 inflammasome, its regulation occurs predominantly at post-transcriptional and post-translational levels, which may explain the absence of transcriptional differences. Previous findings indicate that IL-18 and IL-1 β are differentially regulated, with IL-1 β expression often downregulated under conditions of chronic stimulation [38,39]. Moreover, *CASP1* and *NLRP3* are also modulated by complex post-translational mechanisms, and the lack of detectable changes in peripheral blood may reflect the localized nature of inflammasome activation at ulcer sites, as systemic transcriptional profiles may not fully capture tissue-specific inflammatory activity [33,40].

HU treatment did not appear to modify the expression profile of the analyzed genes, as *IL18* remained downregulated in both treated and untreated patients with ulcers. This finding suggests that HU therapy, although known for its anti-inflammatory and antioxidant properties, may not directly influence the transcriptional regulation of inflammasome-related genes in the context of LUs. These observations are consistent with the results reported by Pitanga et al. (2021), who found that HU treatment in SCA patients reduced *NLRP3* expression but did not affect *CASP1*, *IL1B* or *IL18* levels [14]. Their findings indicated that HU may not significantly modulate inflammasome-dependent inflammatory pathways in SCA. An earlier study by Pitanga et al. (2016) demonstrated that HU treatment in PBMCs incubated with SS-erythrocytes led to an increase in *IL18* expression, without significant changes in *NLRP3*, *CASP1* or *IL1B* expression [41]. Together, these studies suggest that while HU may modulate specific pathways under controlled in vitro stimulation, its in vivo effects on inflammasome activation appear to be limited or indirect.

We acknowledge certain limitations in our study. A more detailed characterization of the local ulcer microenvironment, through analysis of gene

expression or cytokine profiles directly at the lesion site, was not feasible, as most patients declined the invasive sampling procedure. Additionally, the expression of NLRP3 inflammasome genes in SCA and LUs is likely dynamic and temporally regulated, which may not be adequately captured in a cross-sectional design.

Taken together, these findings support the involvement of the NLRP3 inflammasome pathway in the pathophysiology of SCA LUs and point to a differential regulation of its components during active and healed stages. The consistent downregulation of *IL18* suggests an imbalance in cytokine-mediated signaling that could compromise reparative and immune processes in chronic ulceration. Understanding these molecular patterns may provide new insights into the mechanisms driving impaired wound healing in SCA and highlight potential therapeutic targets to modulate inflammation and promote tissue repair.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.V.D. performed experiments, performed statistical analyses, interpreted data and drafted the manuscript. A.P.S., G.S.A., J.V.S.R., S.L.G.G., L.R.S.V. performed experiments, updated the clinical data, and interpreted data. A.P.S., A.R.L-A., G.S.A. and I.F.D. updated the clinical data and reviewed the manuscript. A.C.M.A., A.P.S., A.S.A., G.S.A., M.A.C.B., M.V.D. and T.H.C.B recruited patients, assured access to patients' samples, and updated the clinical data. A.R.L-A., G.S.A., I.F.D. and M.A.C.B. conceived and designed the study, analysed and interpreted data, and reviewed the manuscript. M.A.C.B. gave the final approval of the version to be submitted.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge all patients cooperating in this study.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant #405918/2022-4) and (CNPq, Grant #408710/2021-7).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no competing financial interests.

ETHICS STATEMENT

The local research ethics board approved this study (approval number 49177021.8.0000.5208), and following the Declaration of Helsinki, informed consent was obtained from all participants before the study commencement

REFERENCES

- [1] Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.10>.
- [2] Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *The Lancet* 2010;376:2018–31. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61029-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61029-X).
- [3] Saah E, Fadaei P, Gurkan UA, Sheehan V. Sickle Cell Disease Pathophysiology and Related Molecular and Biophysical Biomarkers. *Hematol Oncol Clin North Am* 2022;36:1077–95. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2022.06.005>.
- [4] Minniti CP, Eckman J, Sebastiani P, Steinberg MH, Ballas SK. Leg ulcers in sickle cell disease. *Am J Hematol*, vol. 85, Wiley-Liss Inc.; 2010, p. 831–3. <https://doi.org/10.1002/ajh.21838>.
- [5] Minniti CP, Kato GJ. Critical Reviews: How we treat sickle cell patients with leg ulcers. *Am J Hematol* 2016;91:22–30. <https://doi.org/10.1002/ajh.24134>.
- [6] Spira JAO, Abreu MNS, Guedes ACM, Borges EL. Factors associated with the occurrence of leg ulcers in people with sickle cell disease: A case-control study. *Blood Cells Mol Dis* 2025;112. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2025.102922>.
- [7] Ladizinski B, Bazakas A, Mistry N, Alavi A, Sibbald RG, Salcido R. Sickle cell disease and leg ulcers. *Adv Skin Wound Care* 2012;25:420–8. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000419408.37323.0c>.
- [8] Alavi A, Kirsner RS. Hemoglobinopathies and Leg Ulcers. *International Journal of Lower Extremity Wounds* 2015;14:213–6. <https://doi.org/10.1177/1534734615600069>.
- [9] Conran N, Belcher JD. Inflammation in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 2018;68:263–99. <https://doi.org/10.3233/CH-189012>.
- [10] Vats R, Brzoska T, Bennewitz MF, Jimenez MA, Pradhan-Sundt T, Tutuncuoglu E, et al. Platelet extracellular vesicles drive inflammasome-IL-1 β -dependent lung injury in sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2020;201:33–46. <https://doi.org/10.1164/rccm.201807-1370OC>.
- [11] Sundt P, Gladwin MT, Novelli EM. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2019;14:261–90. <https://doi.org/10.1146/annurev->

pathmechdis.

- [12] Salgar S, Bolívar BE, Flanagan JM, Anum SJ, Bouchier-Hayes L. The NLRP3 inflammasome fires up heme-induced inflammation in hemolytic conditions. *Translational Research* 2023;252:34–44. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2022.08.011>.
- [13] Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T, et al. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol* 2015;4:296–307. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.008>.
- [14] Pitanga TN, Santana SS, Zanette DL, Guarda CC, Santiago RP, Maffili V V., et al. Effect of lysed and non-lysed sickle red cells on the activation of NLRP3 inflammasome and LTB4 production by mononuclear cells. *Inflammation Research* 2021;70:823–34. <https://doi.org/10.1007/s00011-021-01461-2>.
- [15] Nyakundi BB, Tóth A, Balogh E, Nagy B, Erdei J, Ryffel B, et al. Oxidized hemoglobin forms contribute to NLRP3 inflammasome-driven IL-1 β production upon intravascular hemolysis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2019;1865:464–75. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.10.030>.
- [16] Domingos IF, Pereira-Martins DA, Sobreira MJVC, Oliveira RTD, Alagbe AE, Lanaro C, et al. High levels of proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8 are associated with a poor clinical outcome in sickle cell anemia. *Ann Hematol* 2020;99:947–53. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-03978-8>.
- [17] Belisário AR, Mendes-Oliveira F, de Souza VR, Bolina-Santos E, Mendes FG, Moreno EC, et al. Association between inflammatory molecules, nitric oxide metabolites and leg ulcers in individuals with sickle cell anemia. *Hematol Transfus Cell Ther* 2022;44:169–76. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.09.152>.
- [18] Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J. Rapid analysis of - α 3.7 thalassaemia and $\alpha\alpha\alpha$ anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol* 1992;82:105–11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1993.tb04639.x>.
- [19] Powars DR. Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991;5:475–93.
- [20] Catella J, Guillot N, Nader E, Skinner S, Poutrel S, Hot A, et al. Controversies in the pathophysiology of leg ulcers in sickle cell disease. *Br J Haematol* 2024;205:61–70. <https://doi.org/10.1111/bjh.19584>.
- [21] Santos E do C, Santana PVB, Jesus LLS de, Melo GIV, Yahouédéhou SCMA, Guarda CC da, et al. Leg Ulcers in Sickle Cell Disease: A Multifactorial Analysis Highlights the Hemolytic Profile. *Hematol Rep* 2023;15:119–29. <https://doi.org/10.3390/hematolrep15010013>.
- [22] Jackson TA, Buscetta AJ, Ramirez HC, Bonham VL, Minniti CP. Leg ulcers are indicators of systemic dysfunction in individuals with sickle cell disease. *Am J*

- Hematol 2024;99:767–9. <https://doi.org/10.1002/ajh.27250>.
- [23] Ranque B, Diaw M, Dembele AK, Lapoumeroulie C, Offredo L, Tessougue O, et al. Association of haemolysis markers, blood viscosity and microcirculation function with organ damage in sickle cell disease in sub-Saharan Africa (the BIOCADRE study). *Br J Haematol* 2023;203:319–26. <https://doi.org/10.1111/bjh.19006>.
 - [24] Batista T, Santana R, Sobreira M, Arcanjo G, Domingos I, Pereira-Martins D, et al. Up- regulation of miR- 130a is related to leg ulcers in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2022;197:e16–8. <https://doi.org/10.1111/bjh.18018>.
 - [25] Santos EDC, Melo GIV, Santana PVB, Quadros IGS, Yahouédéhou SCMA, da Guarda CC, et al. A Description of the Hemolytic Component in Sickle Leg Ulcer: The Role of Circulating miR-199a-5p, miR-144, and miR-126. *Biomolecules* 2022;12:1–10. <https://doi.org/10.3390/biom12020317>.
 - [26] Rêgo MJB, da Silva RR, Pereira MC, da Silva Araújo A, Pitta I da R, Falcão DA, et al. Evaluation of CD4+CD25+FoxP3+ T cell populations, IL-10 production, and their correlation with clinical and biochemical parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine* 2015;75:310–5. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.07.016>.
 - [27] Da Silva RR, Pereira MC, Melo Rêgo MJB, Domingues Hatzlhofer BL, Da Silva Araújo A, Cavalcanti Bezerra MA, et al. Evaluation of Th17 related cytokines associated with clinical and laboratorial parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine* 2014;65:143–7. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.11.012>.
 - [28] Lee JH, Cho DH, Park HJ. IL-18 and cutaneous inflammatory diseases. *Int J Mol Sci* 2015;16:29357–69. <https://doi.org/10.3390/ijms161226172>.
 - [29] Sabuncu T, Eren MA, Tabur S, Dag OF, Boduroglu O. High serum concentration of interleukin-18 in diabetic patients with foot ulcers. *J Am Podiatr Med Assoc* 2014;104:222–6. <https://doi.org/10.7547/0003-0538-104.3.222>.
 - [30] Hussein IK, Shani WS. Gene expression levels of inflammatory mediators in diabetic foot ulcer patients. *Journal of Biotechnology Research Center* 2023;17:27–36. <https://doi.org/10.24126/jobrc.2023.17.2.715>.
 - [31] Fabbi M, Carbotti G, Ferrini S. Context-dependent role of IL-18 in cancer biology and counter-regulation by IL-18BP. *J Leukoc Biol* 2015;97:665–75. <https://doi.org/10.1189/jlb.5ru0714-360rr>.
 - [32] Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H. Interleukin-18 in health and disease. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20030649>.
 - [33] Artlett CM. Inflammasomes in wound healing and fibrosis. *Journal of Pathology* 2013;229:157–67. <https://doi.org/10.1002/path.4116>.

- [34] Kämpfer H, Kalina U, Mühl H, Pfeilschifter J, Frank S. Counterregulation of interleukin-18 mRNA and protein expression during cutaneous wound repair in mice. *Journal of Investigative Dermatology* 1999;113:369–74. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00704.x>.
- [35] Kämpfer H, Mühl H, Manderscheid M, Kalina U, Kauschat D, Pfeilschifter J, et al. Regulation of interleukin-18 (IL-18) expression in keratinocytes (HaCaT): implications for early wound healing. *Eur Cytokine Netw* 2000;1:8–11.
- [36] Kaur D, Chachi L, Gomez E, Sylvius N, Brightling CE. Interleukin-18, IL-18 binding protein and IL-18 receptor expression in asthma: a hypothesis showing IL-18 promotes epithelial cell differentiation. *Clin Transl Immunology* 2021;10:1–16. <https://doi.org/10.1002/cti2.1301>.
- [37] Suzuki T, Boonyaleka K, Okano T, Iida T, Yoshida M, Fukano H, et al. Inflammasome-triggered IL-18 controls skin inflammation in the progression of Buruli ulcer. *PLoS Pathog* 2023;19:1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011747>.
- [38] Zhu Q, Kanneganti T-D. Cutting Edge: Distinct Regulatory Mechanisms Control Proinflammatory Cytokines IL-18 and IL-1 β . *The Journal of Immunology* 2017;198:4210–5. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700352>.
- [39] Puren AJ, Fantuzzi G, Dinarello CA. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1 β are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2256–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2256>.
- [40] Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action , role in disease , and therapeutics. *Nat Med* 2015;21:677–87. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>.
- [41] Pitanga TN, Oliveira RR, Zanette DL, Guarda CC, Santiago RP, Santana SS, et al. Sick red cells as danger signals on proinflammatory gene expression, leukotriene B4 and interleukin-1 beta production in peripheral blood mononuclear cell. *Cytokine* 2016;83:75–84. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.03.016>.

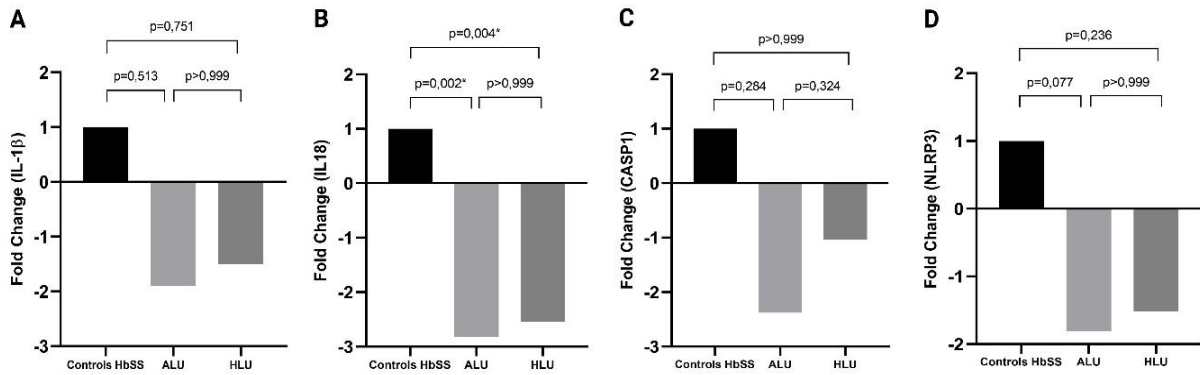


Figure 1. Relative expression of inflammasome-related genes in patients with sickle cell anemia (SCA) according to the clinical status of leg ulcers. Bar graphs represent the fold change in mRNA expression of (A) *IL1B*, (B) *IL18*, (C) *CASP1* and (D) *NLRP3* in peripheral blood leukocytes from individuals with SCA without leg ulcers (Control HbSS), patients with active leg ulcers (ALU) and patients with healed leg ulcers (HLU). Data were normalized to *GAPDH* as an endogenous control gene and expressed as fold change relative to the Control HbSS group. Statistical analysis was performed using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s post hoc test. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

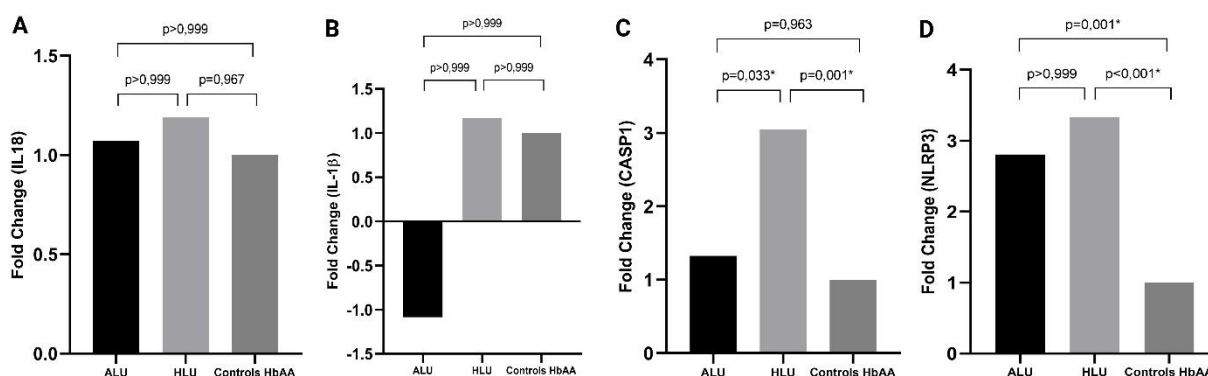
Table 1. Baseline clinical and laboratory features of SCA patients according to the LU status.

| Characteristics of patients | All patients (n = 76) | | Active LU (n = 23) | | Healed LU (n = 22) | | Controls HbSS (n=31) | | P-value* |
|---|-----------------------|------|--------------------|------|--------------------|------|----------------------|------|----------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | |
| Sex | | | | | | | | | |
| Female | 38 | 50 | 11 | 47,8 | 12 | 54,5 | 15 | 48,4 | 0,879 |
| Male | 38 | 50 | 12 | 52,2 | 10 | 45,5 | 16 | 51,6 | |
| Age (years) median | 36 | | 40 | | 37 | | 31 | | 0,023* |
| Range | 18-60 | | 24-60 | | 19-57 | | 18-49 | | |
| VOCs/per year | | | | | | | | | |
| Missing data | 4 | 5,3 | 0 | 0 | 1 | 4,5 | 3 | 9,7 | 0,508 |
| <3 | 34 | 44,6 | 9 | 39,1 | 9 | 40,9 | 16 | 51,6 | |
| 3 - 6 | 25 | 8,0 | 8 | 34,8 | 8 | 36,4 | 9 | 29,0 | |
| >6 | 13 | 6,0 | 6 | 26,1 | 4 | 18,2 | 3 | 9,7 | |
| Hb (g/dL) median | 7,8 | | 7,0 | | 7,6 | | 8,5 | | 0,014* |
| Hb F (%) median | 5,8 | | 4,0 | | 8,0 | | 7,2 | | 0,004* |
| Reticulocyte (%) median | 9,2 | | 9,3 | | 8,4 | | 9,3 | | 0,944 |
| WBC (x 10 ⁹ /L) median | 11590 | | 12200 | | 10500 | | 11500 | | 0,615 |
| Platelets (x 10 ⁹ /L) median | 402000 | | 371500 | | 402000 | | 452000 | | 0,565 |
| TB (mg/dL) median | 3,11 | | 3,21 | | 3,56 | | 2,95 | | 0,302 |
| IB (mg/dL) median | 2,30 | | 2,08 | | 2,85 | | 2,28 | | 0,482 |
| LDH (U/L) median | 753 | | 938,5 | | 822,5 | | 544 | | 0,119 |
| Hydroxyurea therapy | | | | | | | | | |
| Missing data | 3 | 3,9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 9,7 | <0,0001 |
| Yes | 25 | 32,9 | 12 | 52,2 | 13 | 59,1 | 0 | 0 | |
| No | 48 | 63,2 | 11 | 47,8 | 9 | 40,9 | 28 | 90,3 | |
| β ^S haplotype | | | | | | | | | |
| Missing data | 9 | 11,8 | 2 | 8,7 | 2 | 9,1 | 5 | 6,1 | 0,244 |
| CAR/CAR | 40 | 52,7 | 13 | 56,5 | 9 | 40,9 | 18 | 8,1 | |
| Non-CAR/CAR | 27 | 35,3 | 8 | 34,8 | 11 | 50,0 | 8 | 5,8 | |
| α-thalassemia (α ^{-3.7kb}) | | | | | | | | | |
| Missing data | 7 | 9,2 | 2 | 8,7 | 2 | 9,1 | 3 | 9,7 | 0,808 |
| Mutated | 15 | 19,7 | 11 | 21,7 | 9 | 22,7 | 5 | 16,1 | |
| Non-mutated | 54 | 71,1 | 12 | 69,6 | 13 | 68,2 | 23 | 74,2 | |

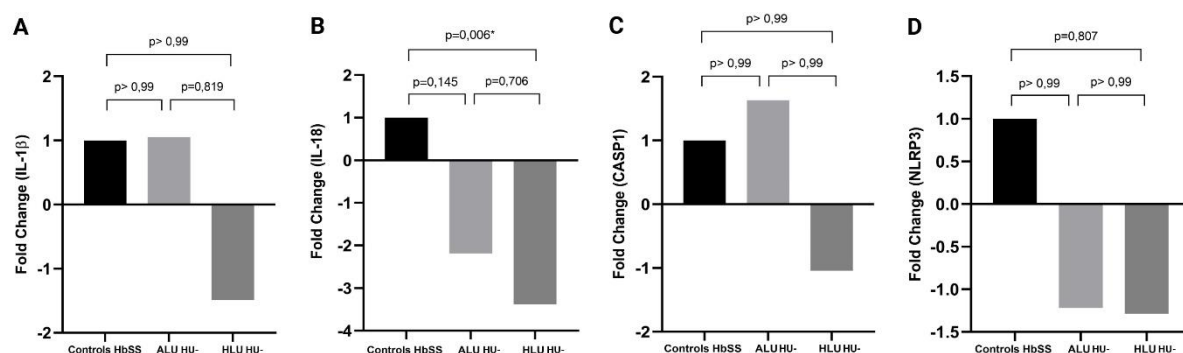
VOC, vaso-occlusive crisis; RBC, red blood cell; Hb, haemoglobin; Hb F, foetal haemoglobin; WBC, white blood cells; TB: total bilirubin; IB, indirect bilirubin; LDH, lactate dehydrogenase; CAR, Central African Republic. Laboratory parameters are described as median. Mutated alpha thalassemia are defined by one or two deletional α genes.

* Statistically significant difference (p < 0.05).

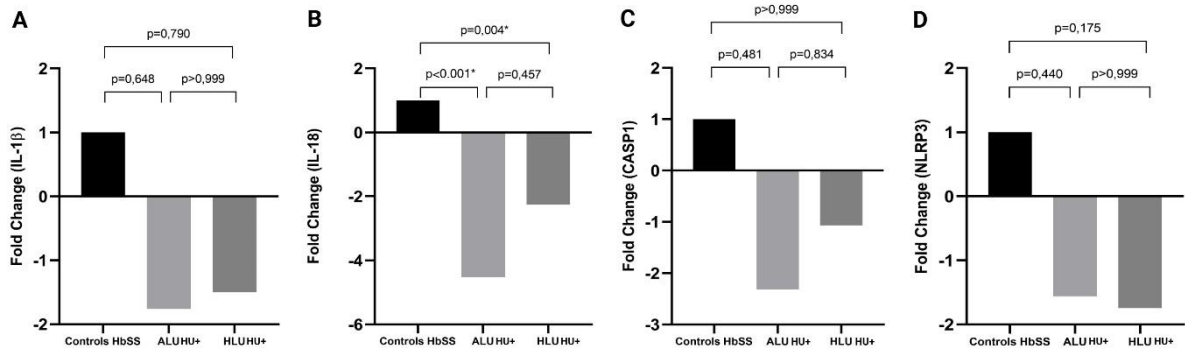
SUPPLEMENTAL MATERIAL



Supplementary Figure 1: Relative expression of inflammasome-related genes in patients with sickle cell anemia (SCA) and leg ulcers compared to individuals with normal hemoglobin profile. Bar graphs represent the fold change in mRNA expression of (A) *IL1B*, (B) *IL18*, (C) *CASP1* and (D) *NLRP3* in peripheral blood leukocytes from individuals with normal hemoglobin profile without leg ulcers (Control HbAA), patients with active leg ulcers (ALU), and patients with healed leg ulcers (HLU) under HU therapy. Data were normalized to *GAPDH* as an endogenous control gene and expressed as fold change relative to the Control HbAA group. Statistical analysis was performed using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s post hoc test. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).



Supplementary Figure 2: Relative expression of inflammasome-related genes in patients with sickle cell anemia (SCA) and leg ulcers not under hydroxyurea therapy and controls. Bar graphs represent the fold change in mRNA expression of (A) *IL1B*, (B) *IL18*, (C) *CASP1* and (D) *NLRP3* in peripheral blood leukocytes from individuals with SCA without leg ulcers (Control HbSS), patients with active leg ulcers (ALU), and patients with healed leg ulcers (HLU). This analysis was conducted including only patients with LUs who were not under HU therapy. Data were normalized to *GAPDH* as an endogenous control gene and expressed as fold change relative to the Control HbSS group. Statistical analysis was performed using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s post hoc test. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).



Supplementary Figure 3: Relative expression of inflammasome-related genes in patients with sickle cell anemia (SCA) and leg ulcers under hydroxyurea therapy and controls. Bar graphs represent the fold change in mRNA expression of (A) *IL1B*, (B) *IL18*, (C) *CASP1* and (D) *NLRP3* in peripheral blood leukocytes from individuals with SCA without leg ulcers (Control HbSS), patients with active leg ulcers (ALU) and patients with healed leg ulcers (HLU) under HU therapy. Data were normalized to *GAPDH* as an endogenous control gene and expressed as fold change relative to the Control HbSS group. Statistical analysis was performed using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s post hoc test. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Dentre as complicações mais incapacitantes da AF, destacam-se as úlceras maleolares (UMs), cuja fisiopatologia permanece parcialmente elucidada, apesar dos avanços recentes. O presente estudo contribui de forma relevante para o entendimento dos mecanismos inflamatórios subjacentes às UMs na AF, ao investigar o perfil de citocinas inflamatórias e a expressão gênica em uma coorte de pacientes adultos acompanhados na Fundação HEMOPE.

Os resultados obtidos nesse estudo reforçam a hipótese de que a inflamação crônica é um componente central na gênese e manutenção das UMs. Foi observado que pacientes com UM (UM aberta e fechada) mostraram níveis elevados das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-12p70 quando comparados aos controles HbSS. Além disso, independentemente do uso de HU, pacientes com UM apresentaram níveis elevados de TNF- α e IL-12p70 quando comparados aos controles HbSS, sugerindo um impacto limitado da HU na inflamação em pacientes com UM. Este achado é particularmente relevante, pois sugere que a HU, embora eficaz na redução de crises vaso-oclusivas e na elevação da hemoglobina fetal (HbF), pode não ser suficiente para controlar a inflamação associada às lesões cutâneas. A persistência de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-12p70, indica a necessidade de abordagens terapêuticas complementares, possivelmente direcionadas ao bloqueio específico dessas vias inflamatórias.

A análise de comparação com os subgrupos de úlcera (UM aberta e UM fechada) mostrou que indivíduos com UMA possuíam níveis elevados de TNF α e IL-10 comparados aos controles HbSS, enquanto os indivíduos com UMF possuíam níveis elevados de TNF α , IL-8 e IL-12 em comparação ao mesmo grupo.

A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e os escores de importância variável na projeção (VIP) mostraram que TNF- α e IL-8 foram identificadas como citocinas discriminatórias essenciais na distinção entre os grupos clínicos, sugerindo que essas moléculas podem servir como potenciais biomarcadores para estratificação de risco e acompanhamento terapêutico. Além disso, a forte correlação entre citocinas inflamatórias e marcadores hemolíticos aponta para uma inter-relação entre hemólise, inflamação e dano tecidual, ampliando o entendimento sobre a fisiopatologia das UMs.

No âmbito molecular, o perfil de expressão gênica do inflamassoma NLRP3

revelou aumento significativo de *CASP1* e *NLRP3* nos grupos com UMs ativas e cicatrizadas em relação aos controles saudáveis. Observou-se, ainda, redução significativa da expressão de *IL18* em pacientes com úlceras ativas e cicatrizadas, independentemente do uso de HU, sugerindo que a diminuição de *IL18* pode estar relacionada à cronicidade das lesões, possivelmente por desregulação da sinalização mediada por IL-18 no ambiente inflamatório crônico das UMs.

Esses achados têm perspectiva de aplicação para a prática clínica. Primeiramente, evidenciam a necessidade de protocolos de tratamento mais abrangentes, que incluam não apenas a HU, como também agentes anti-inflamatórios específicos, como inibidores de TNF- α ou moduladores da via IL-12/IL-8. Estudos recentes em outras doenças inflamatórias crônicas demonstram o potencial dessas terapias em promover cicatrização e reduzir recidivas, o que pode ser explorado em ensaios clínicos futuros para pacientes com AF e UMs. Além disso, a segmentação dos pacientes por perfil inflamatório pode auxiliar na identificação precoce daqueles com maior risco de complicações, permitindo intervenções mais precoces e personalizadas.

Outro ponto de destaque é a estratificação dos pacientes por perfil das UMs (abertas e fechadas), que permitiu uma análise mais refinada dos mecanismos envolvidos. Nossos achados indicam que a persistência da inflamação em pacientes com UMF sugere um estado inflamatório crônico que pode predispor à recorrência, destacando a necessidade de estratégias de tratamento de longo prazo.

Em síntese, o presente estudo reforça o papel central da inflamação na fisiopatologia das úlceras maleolares na anemia falciforme, evidencia a necessidade de terapias anticitocinas direcionadas e aponta para a importância da estratificação clínica e laboratorial dos pacientes. O aprofundamento do conhecimento sobre os mecanismos moleculares e celulares envolvidos abre novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes, com potencial para transformar o manejo clínico e os desfechos dos pacientes com AF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accioly J. (1947) Anemia falciforme – apresentação de um caso com infantilismo; Arquivo da Universidade da Bahia – Faculdade de Medicina da Bahia 2:169–198;
- Accogli T, Hibos C and Vegrán F (2023) Canonical and non-canonical functions of NLRP3. *J Adv Res* 53:137–151;
- Alagbe AE, Domingos IF, Adekile AD, Blotta MHSL and Santos MNN (2022) Anti-inflammatory cytokines in sickle cell disease. *Mol Biol Rep* 49:2433–2442;
- Alehashemi S and Goldbach-Mansky R (2020) Human Autoinflammatory Diseases Mediated by NLRP3-, Pyrin-, NLRP1-, and NLRC4-Inflammasome Dysregulation Updates on Diagnosis, Treatment, and the Respective Roles of IL-1 and IL-18. *Front Immunol*. doi: 10.3389/fimmu.2020.01840;
- Allali S, Maciel TT, Hermine O and De Montalembert M (2020) Innate immunecells, major protagonists of sickle cell disease pathophysiology. *Haematologica* 105:273–283;
- Blevins HM, Xu Y, Biby S and Zhang S (2022) The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Front Aging Neurosci*. doi: 10.3389/fnagi.2022.879021;
- Conran N and Belcher JD (2018) Inflammation in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 68:263–299;
- Conran N and Embury SH (2021) Sickle cell vaso-occlusion: The dialectic between red cells and white cells. *Exp Biol Med* 246:1458–1472;
- de Freitas Dutra V, Leal VNC, Fernandes FP, Souza CRL, Figueiredo MS and Pontillo A (2022) Genetic contribution and functional impairment of inflammasome in sickle cell disease. *Cytokine*. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155717;
- Erdei J, Tóth A, Balogh E, Nyakundi BB, Bányai E, Ryffel B, Paragh G, Cordero MD and Jeney V (2018) Induction of NLRP3 Inflammasome Activation by Heme in Human Endothelial Cells. *Oxid Med Cell Longev* 2018:1–14;
- Ferrone FA (2018) Targeting HbS Polymerization. *Semin Hematol* 55:53–59.
- Hafner-Bratkovič I (2023a) Inflammasome formation and triggers; *Inflammasome Biology*. Elsevier, pp 17–32;
- Hahn E v and Gillespie EB (1927) Sickle cell anemia: report of a case greatly

improved by splenectomy. Experimental study of sickle cell formation. Arch Intern Med (Chic) 39:233–254;

Herrick J (1910) Peculiar Elongated and Sickle-Shaped Red Blood Corpuscles in a Case of Severe Anemia. Arch Intern Med (Chic) 6:517–521;

Inusa BPD, Hsu LL, Kohli N, Patel A, Ominu-Evbota K, Anie KA and AtoyebiW (2019) Sickle cell disease—genetics, pathophysiology, clinical presentation and treatment. Int J Neonatal Screen. doi: 10.3390/ijns5020020;

Jiménez-Castro MB, Cornide-Petronio ME, Gracia-Sancho J and Peralta C (2019) Inflammasome-mediated inflammation in liver ischemia-reperfusion injury. Cells. doi: 10.3390/cells8101131;

Kapoor S, Little JA and Pecker LH (2018) Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease. Mayo Clin Proc 93:1810–1824;

Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, Smith WR, Panepinto JA, Weatherall DJ, Costa FF et al. (2018a) Sickle cell disease. Nat Rev Dis Primers. doi: 10.1038/nrdp.2018.10;

Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, Smith WR, Panepinto JA, Weatherall DJ, Costa FF et al. (2018b) Sickle cell disease. Nat Rev Dis Primers 4:1–22;

Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. Blood Rev. 2007 Jan;21(1):37- 47;

Kavanagh PL, Fasipe TA and Wun T (2022) Sickle Cell Disease: A Review. JAMA 328:57–68;

Kutlar A and Embury SH (2014) Cellular adhesion and the endothelium: P- selectin. Hematol Oncol Clin North Am 28:323–339;

Liu Y, Sun Y, Kang J, He Z, Liu Q, Wu J, Li D, Wang X, Tao Z, Guan X et al.(2022) Role of ROS-Induced NLRP3 Inflammasome Activation in the Formation of Calcium Oxalate Nephrolithiasis. Front Immunol. doi: 10.3389/fimmu.2022.818625;

Meyers AK and Zhu X (2020) The NLRP3 Inflammasome: Metabolic Regulation and Contribution to Inflammation. Cells 9:1–22; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2024;

Missiroli S, Perrone M, Boncompagni C, Borghi C, Campagnaro A, MarchettiF, Anania G, Greco P, Fiorica F, Pinton P et al. (2021a) Targeting the nlrp3 inflammasome as a new therapeutic option for overcoming cancer. Cancers (Basel). doi: 10.3390/cancers13102297;

Missiroli S, Perrone M, Boncompagni C, Borghi C, Campagnaro A, MarchettiF,

Anania G, Greco P, Fiorica F, Pinton P et al. (2021b) Targeting the nlrp3 inflammasome as a new therapeutic option for overcoming cancer. *Cancers (Basel)*. doi: 10.3390/cancers13102297;

Nader E, Conran N, Romana M and Connes P (2021) Vasculopathy in Sickle Cell Disease: From Red Blood Cell Sickling to Vascular Dysfunction. *Compr Physiol* 11:1785–1803;

Nader E, Romana M and Connes P (2020a) The Red Blood Cell— Inflammation Vicious Circle in Sickle Cell Disease. *Front Immunol* 11:1–11;

Nader E, Romana M and Connes P (2020b) The Red Blood Cell— Inflammation Vicious Circle in Sickle Cell Disease. *Front Immunol*. doi: 10.3389/fimmu.2020.00454;

Paik S, Kim JK, Silwal P, Sasakawa C and Jo EK (2021) An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol* 18:1141–1160;

Pauling L, Itano HA, Singer SJ and Wells IC (1949) Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. 110:543–548;

Piccin A, Murphy C, Eakins E, Rondinelli M, Daves M, Vecchiato C, Wolf D, Mahon CM and Smith OP (2019) Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anemia and possible treatment. *Eur J Haematol* 102:319–330.
PNTN-CGSH/DAET/SAES/MS 2023;

Salgar S, Bolívar BE, Flanagan JM, Anum SJ and Bouchier-Hayes L (2023a) The NLRP3 inflammasome fires up heme-induced inflammation in hemolytic conditions. *Translational Research* 252:34–44;

Salgar S, Bolívar BE, Flanagan JM, Anum SJ and Bouchier-Hayes L (2023b) The NLRP3 inflammasome fires up heme-induced inflammation in hemolytic conditions. *Translational Research* 252:34–44;

Santos HP, Domingos CRB and Castro SM (2021) Twenty Years of Neonatal Screening for Sickle Cell Disease in Brazil: The Challenges of a Continental Country with High Genetic Heterogeneity. *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening* 9:e20210002;

Serjeant GR (2010) One hundred years of sickle cell disease. *Br J Haematol* 151:425–429;

Serjeant GR, Vichinsky E, Herrick J and Mason V (2017) Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. *Blood Cells Mol Dis* 0–1;

Shao BZ, Xu ZQ, Han BZ, Su DF and Liu C (2015) NLRP3 inflammasome and its inhibitors: A review. *Front Pharmacol*. doi: 10.3389/fphar.2015.00262;

Silva-Pinto AC, Alencar de Queiroz MC, Antoniazzi Zamaro PJ, Arruda M and Pimentel dos Santos H (2019) The neonatal screening program in Brazil, focus on

sickle cell disease (SCD). *Int J Neonatal Screen*. doi: 10.3390/ijns5010011;

Sundd P, Gladwin MT and Novelli EM (2019) Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 14:261–90;

Tomasik J and Basak GW (2022) Inflammasomes—New Contributors to Blood Diseases. *Int J Mol Sci* 23:8129;

Torres LS and Hidalgo A (2022) Neutrophils as drivers of vascular injury in sickle cell disease. *Immunol Rev*. doi: 10.1111/imr.13146;

Vats R, Brzoska T, Bennewitz MF, Jimenez MA, Pradhan-Sundd T, Tutuncuoglu E, Jonassaint J, Gutierrez E, Watkins SC, Shiva S et al. (2020) Platelet extracellular vesicles drive inflammasome-IL-1 β -dependent lung injury in sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med* 201:33–46;

Williams TN and Thein SL (2018) Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 19:113–147;

Wortmann M, Klotz R, Kalkum E, Dihlmann S, Böckler D and Peters AS (2022) Inflammasome Targeted Therapy as Novel Treatment Option for Aortic Aneurysms and Dissections: A Systematic Review of the Preclinical Evidence. *Front Cardiovasc Med*. doi: 10.3389/fcvm.2021.805150;

Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H and Shi F (2019) Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis*. doi: 10.1038/s41419-019-1413-8;

Yaron JR (2015) Ion Flux Regulates Inflammasome Signaling. doi: 10.13140/RG.2.2.32297.60007;

Zhang D, Xu C, Manwani D and Frenette PS (2016) Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood* 127:801–809.

CURRÍCULO LATTES DURANTE O VÍNCULO COM O PPGGBM

Madi Veiga Diniz

Endereço

Endereço profissional: Universidade Federal de Pernambuco, Hospital das Clínicas da UFPE
Avenida Professor Moraes Rego, N° 1235
Várzea - Recife
50740900, PE - Brasil
Telefone: 081 21263548

Endereço eletrônico: E-mail para contato : madidiniz1704@gmail.com
E-mail alternativo : madidiniz@gmail.com

Idiomas

| | |
|------------------|--|
| Inglês | Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem |
| Português | Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem |

Formação acadêmica/titulação

| | |
|--------------------|--|
| 2021 | Doutorado em Genética. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil Título: AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME E ÚLCERAS DE MEMBRO INFERIOR Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra Co-orientador: Antônio Roberto Lucena de Araújo |
| 2014 - 2016 | Mestrado em Patologia. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil Título: Candidemias associadas a Neoplasias hematológicas: perfil epidemiológico e sensibilidade antifúngica, Ano de obtenção: 2016 Orientador: Rejane Pereira Neves Co-orientador: Lucas André Cavalcanti Brandão |
| 2016 - 2018 | Especialização em Pós-graduação em Hematologia Clínica e Laboratorial. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil Título: Prevalência e caracterização laboratorial das anemias microcíticas nos pacientes ambulatoriais atendidos no Hospital Agamenon Magalhães da cidade do Recife Orientador: MARCOS ANDRÉ CAVALCANTI BEZERRA |
| 1998 - 1999 | Especialização em Patologia Clínica. Instituto de Ciências Biológicas - UPE, ICB, Brasil Título: Prevalência da Hemoglobina "S" em recém-nascidos do Hospital Agamenon Magalhães Orientador: Dr. Aderson da Silva Araújo |
| 1989 - 1992 | Graduação em Biomedicina. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil |
| 1986 - 1988 | Ensino Médio (2o grau) . |

Formação complementar

| | |
|--------------------|--|
| 2022 - 2022 | Curso de curta duração em MINICURSO CITOGENÉTICA HUMANA NO DIAGNÓSTICO CLÍNICO. (Carga horária: 4h). - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil |
| 2022 - 2022 | Curso de curta duração em MINICURSO PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL: BASES E APLICAÇÕES NA ANÁLISE DE. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil |
| 2021 - 2021 | Curso de curta duração em 2º curso on-line de Interpretação do hemograma. (Carga horária: 75h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil |

Atuação profissional

. HOSPITAL DAS CLÍNICAS - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - HC-UFPE

1994 - Atual Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Biomédica , Carga horária: 40, Regime: HOSPITAL DAS CLÍNICAS - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO Integral
Outras informações:
Funcionária pública lotada no laboratório central do Hospital das Clínicas.

. HOSPITAL AGAMENON MAGALHÃES - HAM

1993 - Atual Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Biomédica , Carga horária: 20, Regime: HOSPITAL AGAMENON MAGALHÃES Parcial

Projetos

Projetos de pesquisa

2021 - Atual AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME E ÚLCERAS DE MEMBRO INFERIOR
Descrição: PROJETO DE DOUTORADO, EM ANDAMENTO, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA DA UFPE REALIZADO PELA DOUTORANDA MADI VEIGA DINIZ E COORDENADO PELO PROF. DR. MARCOS ANDRÉ CAVALCANTI BEZERRA
Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (2); Doutorado (2);
Integrantes: Madi Veiga Diniz (Responsável); ; ALEXSANDRO PEDRO DA SILVA; Domingos, Igor de Farias; ANTÔNIO ROBERTO LUCENA DE ARAÚJO; GABRIELA ARCANJO; Marcos André Cavalcanti Bezerra
Número de produções C,T & A: 1/ .

Revisor de periódico

2023 - Atual Revista Multidisciplinar em Saúde I

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica / Especialidade: Hematologia
2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Biologia e Fisiologia dos Microorganismos / Especialidade: Micologia
3. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia
4. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica
5. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **DINIZ, M. V.**; LIMA, KLEDOALDO. HAEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS ASSOCIATED WITH CANDIDA SPP.. 1021877/2448-3877202400143. v.56, p.28, 2024.
2. ARCANJO, GABRIELA S.; SOUZA, MARIANA B.; DOMINGOS, IGOR F.; PEREIRA'MARTINS, DIEGO A.; FALCÃO, DIEGO A.; BATISTA, JESSICA V.; HATZLHOFFER, BETANIA L.; **Diniz, Madi V.**; SILVA, ALEXSANDRO P.; GUARANÁ, WERBSON L.; HAZIN, MANUELA F.; ARAUJO, ADERSON S.; CUNHA, ANDERSON F.; SAAD, SARA O.; COSTA, FERNANDO F.; LUCENA'ARAUJO, ANTONIO R.; BEZERRA, MARCOS ANDRÉ C.. BMP6 and VDR gene polymorphisms are associated with osteonecrosis in a sickle cell anaemia cohort. BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY. v.1, p.1 - 8, 2024.
3. LIMA, K.; **DINIZ, M. V.**. Megakaryoblastic Acute Myeloid Leukemia Associated with a Testicular Tumour in a Young Adult: a Case Report. DOI: <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2024v26n1p57-5>. v.26, p.57 - 59, 2024.
4. **Diniz, Madi Veiga**; DE ARAÚJO, PAULO SÉRGIO RAMOS; BARBOSA, RODRIGO NISKIER FERREIRA; NETO, REGINALDO GONÇALVES DE LIMA; INÁCIO, CÍCERO PINHEIRO; GIMINO, NADJA MARIA ROCHA; DE ASSIS, REIJANE ALVES; LIMA, KLEDOALDO; Neves, Rejane Pereira. Bloodstream infection by candida in patients with hematologic neoplasia: polyphasic taxonomy and antifungal susceptibility / Infecção sanguínea por candida em pacientes com neoplasia hematológica: taxonomia polifásica e suscetibilidade antifúngica. Brazilian Journal of Health Review. v.5, p.3774 - 3786, 2022.
5. SILVA, AP; LIRA, AC; **DINIZ, MV**; NASCIMENTO, AVD; SILVA, WRC; AGUIAR, GR; SILVA, VR; LIMA, K. ANÁLISE DE PADRÕES HEMATOLÓGICOS COMO FERRAMENTA PREDITIVA PARA AVALIAR O RISCO DE ÓBITO EM PACIENTES COM COVID-19. Hematology Transfusion And Cell Therapy. v.43, p.S419, 2021.
6. **DINIZ, MV**; SILVA, AP; LIRA, AC; NASCIMENTO, AVD; SILVA, WRC; AGUIAR, GR; SILVA, VR; LIMA, K. AVALIAÇÃO DA DOSAGEM DO D-DÍMERO EM PACIENTES GRAVES COM COVID-19, INTERNADOS EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA, EM HOSPITAL PÚBLICO TERCIÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO. Hematology Transfusion And Cell Therapy. v.43, p.S509, 2021.
7. LIMA, KLEDOALDO; SILVA, ALEXSANDRO PEDRO DA; **Diniz, Madi Veiga**; LIRA, ALINE CAVALCANTE DE; NASCIMENTO, ARIONE VIEIRA DO; SILVA, WAGNER ROBERTO CIRILO DA; KAROLINA VANDERLEI MACEDO, ANA. Relapse of clinical symptoms of COVID-19 or probable reinfection in a laboratory professional: a case report from Northeast Brazil. RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT. v.10, p.e13210514730, 2021.

8. LIMA, K.; **DINIZ, M. V.**; SILVA, A. P.; NASCIMENTO, A. V.; LIRA, A. C.; SILVA, W. R. C.; CAMPELO JUNIOR, E. B.; PEREIRA, C. L. D.; RODRIGUES, M. L.. Vitamin D levels and SARS-CoV-2 assay results in health care workers in Brazil. REVISTA DA ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA. v.67, p.1226 - 1228, 2021.

Artigos aceitos para publicação

1. DINIZ, M. V.; BEZERRA, M. A. C.; ARAUJO, A. R. L.; Domingos, Igor de Farias; SILVA, A. P.; ARCANJO, G.; ARAUJO, ADERSON S.; COSTA, FERNANDO F.; SAAD, SARA O.; **DINIZ, M. V.** Inflammatory Cytokine Profile in Patients with Sickle Cell Anaemia and Leg Ulcers. BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY. , 2025.

2. **DINIZ, M. V.**; CARVALHO, P.R.C.; CAVALCANTI, T.V.O.; LIMA, L.F.; SILVA, B.A.B.ACUTE EFFECTS OF DIFERENT INTENSITIES RESISTANCE TRAINING ON INFLAMMATORY MARKERS OF WOMEN WITH SEVERE OBESITY. ADVANCES IN PHYSICAL EDUCATION. , p.2058, 2022.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **DINIZ, M. V.**. ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE KL E DOS NÍVEIS SÉRICOS DO KLOTHO SOLÚVEL EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME In: HEMO 2023, 2023, SÃO PAULO. **HEMO 2023**2023,

2. **DINIZ, M. V.**. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO RS10754558 DO GENE NLRP3 COM A OCORRÊNCIA DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME In: HEMO 2023, 2023, SÃO PAULO. **HEMO 2023**2023,

3. **DINIZ, M. V.**. GRÂNULOS VERDES BRILHANTES: RELATODE TRÊS CASOS CLÍNICOS COM DESFECHOS DIVERGENTES In: HEMO 2023, 2023, SÃO PAULO. **HEMO 2023**2023,

4. SILVA, ADRIANA MARIA DA; SILVA, ALEXSANDRO PEDRO DA; SILVA, DYEGO REWORÊDO CARVALHO; **Diniz, Madi Veiga**; ROSA, SIMONE PATRÍCIA DE FREITAS. INCLUSÕES VERDES BRILHANTES NOS NEUTRÓFILOS EM PACIENTE CRÍTICO COM COVID-19 : UM RELATO DE CASO In: III Congresso Brasileiro de Hematologia Clínicolaboratorial Online, 2023, **Anais do III Congresso Brasileiro de Hematologia Clínico-laboratorial On-line**Revista Multidisciplinar em Saúde, 2023, v.4,

5. ROSA, SIMONE PATRÍCIA DE FREITAS; SILVA, ALEXSANDRO PEDRO DA; SILVA, ADRIANA MARIA DA; SILVA, DYEGO REWORÊDO DE CARVALHO; **Diniz, Madi Veiga**. LEUCEMIA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS E TRICOLEUCEMIA: RELATO DE CASO RARO In: III Congresso Brasileiro de Hematologia Clínicolaboratorial Online, 2023, **Anais do III Congresso Brasileiro de Hematologia Clínico-laboratorial On-line**Revista Multidisciplinar em Saúde, 2023, v.4,

Apresentação de trabalho e palestra

1. DINIZ, M. V.; LIMA, K.; A, CLAUDIA; SILVA, A. P.; CAVALCANTI, L. C. L.; **DINIZ, MV**. COINFECÇÃO POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA E SUA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANA EM PACIENTES COM COVID-19 GRAVE INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA, 2022. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

2. **DINIZ, MV**; BEZERRA, M. A. C.; ARCANJO, G.; SILVA, A. P.; ALCÂNTARA, B.V.; HATZLHOFFER, B. L.; SILVA, D.R.C.; ARAUJO, A. R. L.. LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA RESISTENTE AOTRATAMENTO: UM RELATO DE CASO, 2022. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

3. SILVA, ALEXSANDRO PEDRO DA; ARCANJO, G.; ROSA, S. P. F.; ALCÂNTARA, B.V.; Domingos, Igor de Farias; BEZERRA, M. A. C.; **DINIZ, MV**. Perfil de ativação dos genes do inflamassoma NLRP 3,

CASP 1, IL 18 e IL 19 em indivíduos com anemia falciforme e úlceras de membro inferior, 2022. (Outra, Apresentação de Trabalho)

4. DINIZ, M. V.; **DINIZ, M. V.**. ANÁLISES CLÍNICAS: UMA NOVA PERCEPÇÃO, 2021. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Educação e Popularização de C&T

Participação em eventos, congressos, exposições, feiras e olimpíadas

1. **SEGENBIO I SEMANA DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**, 2023. (Outra).
2. **III WORKSHOP DE INTERPRETAÇÃO DO HEMOGRAMA**, 2022. (Outra).

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. MARIA HAYDEÉ DE ANDRADE RAMOS. **ANEMIA DA DOENÇA CRÔNICA ASSOCIADA A INFECÇÕES OPORTUNISTAS EM PACIENTES VIVENDO COM HIV**. 2025. Curso (BIOMEDICINA) - UNIPESU

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **57º CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA E MEDICINA LABORATORIAL**, 2025. (Congresso) RELATO DE CASO DE DEFICIÊNCIA DA ENZIMA G6PD (GLICOSE 6 FOSFATO DESIDROGENASE) COM DESFECHO GRAVE.
2. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR**, 2025. (Congresso) Avaliação da eficácia terapêutica do mitapivat em pacientes com doença falciforme: Revisão de literatura..
3. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR**, 2025. (Congresso) A Genetic Risk Score Combining BCL11A and HBS1L-MYB Polymorphisms Is Associated with Fetal Hemoglobin Levels in Patients with Sickle Cell Anemia.
4. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR**, 2025. (Congresso) ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NO GENE MMP8 COM O DESENVOLVIMENTO DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME..
5. Apresentação Oral no(a) **CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA, E HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR**, 2025. (Congresso) PERFIL DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME E ÚLCERAS MALEOLARES.
6. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR**, 2025. (Congresso) OS IMPACTOS DE VARIANTES DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DOS GENES ANXA2 E BMP6 NA OCORRÊNCIA DE OSTEONECROSE NA ANEMIA FALCIFORME: REVISÃO DE LITERATURA.

7. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **HEMO 2024**, 2024. (Congresso) ASSOCIAÇÃO DOS NÍVEIS DE P-SELCTINA SOLÚVEL COM POLIMORFISMOS DO GENE SELP E A OCORRÊNCIA DE CRISES VASO-OCCLUSIVAS E OSTEONECROSE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.

8. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **HEMO 2024**, 2024. (Congresso) TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF RETICULOCYTES FROM SICKLE CELL ANEMIA PATIENTS WITH HIGH AND LOW FETAL HEMOGLOBIN LEVELS.

9. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **HEMO 2024**, 2024. (Congresso) POLIMORFISMOS NO GENE SELP COMO MODULADORES DO QUADRO CLÍNICO DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.

10. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **HEMO 2024**, 2024. (Congresso) PERFIL DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME E ÚLCERAS MALEOLARES.

11. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **HEMO 2024**, 2024. (Congresso) ATUALIZAÇÕES EM TERAPIAS INOVADORAS PARA ANEMIA FALCIFORME: UMA REVISÃO DE LITERATURA.

12. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **HEMO 2024**, 2024. (Congresso) ANEMIA HEMOLÍTICA MICROANGIOPÁTICA TROMBÓTICA SECUNDÁRIA AO CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO COM INFILTRAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA : RELATO DE CASO..

13. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **HEMO 2023**, 2023. (Congresso) ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO RS10754558 DO GENE NLRP3 NA VARIABILIDADE CLÍNICA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME.,

14. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **HEMO 2023**, 2023. (Congresso) GRÂNULOS VERDES BRILHANTES: RELATO DE TRÊS CASOS CLÍNICOS COM DESFECHOS DIVERGENTES.

15. **I SEMANA DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**, 2023. (Outra) .

16. Avaliador no(a) **II CONGRESSO BRASILEIRO ON-LINE MULTIPROFISSIONAL DE ANÁLISES CLÍNICAS E LABORATORIAIS**, 2023. (Congresso) AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA DE PACIENTES QUE FAZEM USO DE LÍTIO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA.

17. Avaliador no(a) **IV CBHL CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA LABORATORIAL**, 2023. (Congresso) RELAÇÃO DO GRUPO SANGUÍNEO ABO COM O PROGNÓSTICO DA INFECÇÃO NA COVID 19: UMA REVISÃO DE LITERATURA.

18. **SEGENBIO I SEMANA DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**, 2023. (Outra) .

19. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULA**, 2022. (Congresso) COAGULOPATIAS RARAS: PERFIL CLÍNICO E LABORATORIAL NO ESTADO DE PERNAMBUCO.

20. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULA**, 2022. (Congresso) RELATO DE CASO: LEUCEMIA MIELOÍDE CRÔNICA RESISTENTE AO TRATAMENTO.

21. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **CONGRESSO PERNAMBUCANO DE CLÍNICA MÉDICA**, 2022. (Congresso) PACIENTE HIV POSITIVO COM NEUROCRIOPTOCOCOSE TRATADO EM HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFPE: RELATO DE CASO.

22. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **II JORNADA DE GENÉTICA**, 2022. (Outra) ANÁLISE PROTEÔMICA DA PRESENÇA DE ÚLCERAS MALEOLARES EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.

23. **III CONGRESSO DE BIOMEDICINA DA REGIÃO NORDESTE**, 2022. (Congresso) .

24. **III WORKSHOP DE INTERPRETAÇÃO DO HEMOGRAMA**, 2022. (Outra) .

25. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **VIII CONGRESSO NORTE NORDESTE DE INFECTOLOGIA**, 2022. (Congresso) COINFECÇÃO POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA E SUA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANA EM PACIENTES COM COVID-19 GRAVE INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA.
26. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **VIII CONGRESSO NORTE NORDESTE DE INFECTOLOGIA**, 2022. (Congresso) COINFECÇÃO POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA E SUA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANA EM PACIENTES COM COVID-19 GRAVE INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA.
27. **VIII CONGRESSO NORTE NORDESTE DE INFECTOLOGIA**, 2022. (Congresso) VARIABILIDADE GENÉTICA DO HIV-1 E RESISTÊNCIA ANTIRRETROVIRAL EM PACIENTES SOB FALHAVIROLOGIA NO ESTADO DO MARANHÃO(NORDESTE-BRASIL), NO ANO DE 2017.
28. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **VIII CONGRESSO NORTE NORDESTE DE INFECTOLOGIA**, 2022. (Congresso) COINFECÇÃO POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM PACIENTES COM COVID-19 GRAVE INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA.
29. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XII JORNADA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA DE PERNAMBUCO**, 2022. (Outra) Perfil de ativação dos genes do inflamassoma NLRP 3, CASP 1, IL 1 β ; e IL 18 em indivíduos com anemia falciforme e úlceras de membro inferior.
30. **XII JORNADA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA DE PERNAMBUCO**, 2022. (Outra) .
31. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XII JORNADA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA DE PERNAMBUCO**, 2022. (Outra) ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE RETICULÓCITOS DE INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME COM PERFIS DE HEMOGLOBINA FETAL BASAL ALTA E BAIXA.
32. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XII JORNADA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA DE PERNAMBUCO**, 2022. (Outra) Análise proteômica da presença de úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme.
33. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XII JORNADA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA DE PERNAMBUCO**, 2022. (Outra) INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE NLRP3 COM A OCORRÊNCIA DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.
34. **II Semana de Hematologia Clínica e Laboratorial**, 2021. (Encontro) .
35. **X Curso de Inverno em Genética e Biologia Molecular**, 2021. (Encontro) .
36. Apresentação (Outras Formas) no(a) **XI JORNADA DA PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**, 2021. (Outra) GENÉTICA APLICADA AO DIAGNÓSTICO.
37. **XI JORNADA DA PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**, 2021. (Outra) .

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. DINIZ, M. V.; **DINIZ, MV**. Participação em banca de LUIZ FELIPE PEREIRA MENDES E THAYZA FERNANDA FARIAS DA SILVA. **APLICAÇÕES DO PATIENT BLOOD MANAGEMENT (PBM) NA PREVENÇÃO DE ANEMIAS EM PACIENTES ONCOLÓGICOS COM DIAGNÓSTICO DE CÂNCER**

NA MEDULA ÓSSEA, 2025. (BIOMEDICINA) UNIPESU.

2. DINIZ, M. V.; **Diniz, M. Veiga**. Participação em banca de RIALYSSON ARAUJO RAMOS. **ASPECTOS LABORATORIAIS DO LINFOMA DE BURKITT: DO HEMOGRAMA À BIOLOGIA MOLECULAR**, 2025. (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

3. DINIZ, M. V.; **Diniz, M. Veiga**. Participação em banca de MAURICIO SOUZA MOURA MACHADO DE ARAUJO. **MECANISMO DE AÇÃO DA HIDROXIURÉIA NA REDUÇÃO DE CRISES VASO- OCLUSIVAS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**, 2025. (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

4. DINIZ, M. V.; **Diniz, M. Veiga**. Participação em banca de Jonathan Guabiraba da Silva. **“TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS COMO ESTRATÉGIA CURATIVA NA ANEMIA FALCIFORME”**, 2025. (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

5. DINIZ, M. V.; França Neto, P. L.; DINIZ, M. V.; **DINIZ, MV**. Participação em banca de Gabriel Lúcio Guimarães dos Santos. **VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS A PERSISTÊNCIA DA HEMOGLOBINA FETAL: UMA VANTAGEM CLÍNICA NA BETA-TALASSEMIA**, 2024. (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

6. DINIZ, M. V.; GUARANÁ, W. L.; **Diniz, Madi Veiga**. Participação em banca de TALITA DOS SANTOS SENA. **ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO RS10754558 DO GENE NLRP3 NA VARIABILIDADE CLÍNICA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME**, 2023. (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

7. DINIZ, M. V.; SILVA, A. P.; **DINIZ, MV**. Participação em banca de LETÍCIA EDUARDA DE OLIVEIRA. **ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS BS E DA ALFA TALASSEMIA NA VARIABILIDADE CLÍNICA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME**, 2023. (Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco.

8. **DINIZ, MV**; FARIAS, I. C. C.. Participação em banca de KARLA ROBERTA SOARES RODRIGUES. **IMPACTO DA INFECÇÃO PELA SARS-COV-2 EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**, 2023. (Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco.

9. DINIZ, M. V.; França Neto, P. L.; **DINIZ, MV**. Participação em banca de MARIA IZABEL SALVADOR DE LIMA. **O USO DE CRIZANLIZUMABE PARA PREVENÇÃO DE CRISES VASO OCLUSIVAS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME: UMA REVISÃO**, 2022. (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

ANEXO A: Parecer consubstanciado da CONEP

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do perfil de ativação dos genes do inflamassoma NLRP3, CASP1, IL1B e IL18 em indivíduos com anemia falciforme e úlceras de membro inferior

Pesquisador: MADI VEIGA DINIZ

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa em genética do comportamento.);

Versão: 3

CAAE: 49177021.8.0000.5208

Instituição Proponente: Centro de Biosciências

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.123.184

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1757001.pdf, de 25/10/2021).

INTRODUÇÃO

A fisiopatologia da anemia falciforme se baseia na formação e instabilidade da HbS, a qual, em condições como hipóxia, diminuição do pH e baixas concentrações de hemoglobina fetal (HbF) sofre polimerização modificando a forma das hemácias, tornando-as falcizadas (Piel et al., 2017; Kato et al. 2018). As hemácias falcizadas são responsáveis pelo processo de vaso-oclusão que causa isquemia tecidual, resultando numa cascata de eventos patológicos, incluindo a hemólise, a disfunção endotelial, inflamação, hipercoagulabilidade, estresse oxidativo e hipoxemia (Papageorgiou et al. 2018; Bender MA., 2021). Acrescido a isso, episódios hemolíticos levam à liberação constante de hemoglobina livre que é oxidada, liberando o grupo heme, um importante padrão molecular associado a danos (DAMP, do inglês Damage-associated molecular patterns), um tipo de PRR (receptores de reconhecimento de padrões intracelulares) (Conran and Belcher 2018). O heme promove a formação de espécies reativas de oxigênio, ativação do receptor Toll-like 4 (TLR4, do inglês, Toll like receptor) e liberação de mais DAMPs derivados de tecidos ou células

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

ANEXO B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO****CENTRO DE BIOCÊNCIAS****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)**

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “Avaliação da expressão gênica do inflamassoma e de citocinas da inflamação em indivíduos com anemia falciforme e úlceras de membro inferior” que está sob a responsabilidade da pesquisadora Madi Veiga Diniz (Endereço: Rua do Futuro, 480, Apto 1802 -Graças - Recife-PE, CEP: 52050-005 – Fone: (81) 99535-1486 – e-mail: madidiniz1704@gmail.com) e sob a orientação do professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra ((81) 99800-8105-macbezerraufpe@gmail.com). Também participam desta pesquisa: Dr. Aderson da Silva Araújo (81) 99976-5136 - aderson.araujo@gmail.com, Dr. Igor Farias Domingos (81) 99609-5839-domingos_if@hotmail.com, Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo (81) 99800-9382 - araujoarl@gmail.com e Madi Veiga Diniz (81) 99535-1486 madidiniz1704@gmail.com.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável. O(a) senhor(a) estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

A úlcera de membros inferiores-UM ou ferida de perna é uma complicação que dura muito tempo, que causa dor e é bem frequente na anemia falciforme (AF). Além disso, as causas que levam os pacientes com AF a desenvolver a úlcera (ferida) não são bem conhecidas. Dessa forma, o objetivo do nosso trabalho é avaliar algumas substâncias do sangue que podem causar o aparecimento dessas feridas na perna em pacientes com anemia falciforme acompanhados pela Fundação HEMOPE.

Portanto, gostaríamos que você doasse 08 ml de sangue (quantidade correspondente a 02 tubos pequenos de coleta de sangue), obtidos usando agulhas e seringas descartáveis, coletados por profissionais capacitados, uma única vez durante sua visita de rotina ao HEMOPE – Recife - PE. Gostaríamos ainda de solicitar sua autorização para utilização dos dados clínicos coletados em prontuários durante seu período de acompanhamento clínico no HEMOPE – Recife - PE.

O risco por nós avaliado é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve

resultante da picada de agulha. Isto pode ser amenizado colocando compressas de gelo nas primeiras horas após a coleta, em seguida, podem ser colocadas compressas mornas para ajudar a eliminar o hematoma mais rapidamente. Além disso, existe a possibilidade de quebra de sigilo por meio da identificação dos pacientes, ainda que involuntária, ou extravio dos exames dos prontuários. A forma de amenizar é por meio do compromisso, confidencialidade e sigilo dos dados coletados, garantindo que as informações não serão divulgadas fora desse projeto.

Como resultado desta pesquisa não estão previstos benefícios diretos para você, entretanto, como benefício indireto os dados obtidos com este estudo poderão ser úteis para o paciente serão obtidos através de maiores esclarecimentos a respeito da fisiopatologia das UMs na AF estudando os genes envolvidos (NLRP3, CASP1 IL-1B, IL-18), oferecendo, assim, novos dados sobre a patogênese desse evento e seu tratamento.

Esclarecemos que os participantes dessa pesquisa têm plena liberdade de se recusar a participar do estudo e que esta decisão não acarretará penalização por parte dos pesquisadores. As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo. 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 após o término da pesquisa. Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial.

Quando for necessário, seu deslocamento em função do estudo, será garantido o ressarcimento de todo e qualquer gasto do participante da pesquisa e de seu acompanhante com o estudo, segundo a Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.21 e IV.3.g. O pesquisador e patrocinador da pesquisa não irão onerar os planos de saúde ou o próprio participante da pesquisa, responsabilizando-se por todos os gastos relativos aos cuidados de rotina (exames e procedimentos) necessários após assinatura do TCLE, segundo a resolução nº 466 de 2012, item III.2.o.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, o (a) senhor (a) 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: cephumanos.ufpe@ufpe.br](mailto:cephumanos.ufpe@ufpe.br)), o Comitê de Ética em Pesquisa do HEMOPE, no endereço: (Rua Joaquim Nabuco, 171, Graças, Recife – PE, CEP: 52011- 000, Tel.: (81) 3182.4771 – e-mail: cep.hemope@gmail.com) ou a CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) comissão do Conselho Nacional de Saúde - CNS, criada através da Resolução 196/96 e com constituição designada pela Resolução 246/97, com a função de implementar as normas e diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, aprovadas pelo Conselho (SRTV 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar – Asa Norte, CEP: 70719-040, Brasília-DF, Tel.: (61) 3315.5878 com atendimento de segunda a sexta das 8 às 19 h – e-mail: cns@saude.gov.br).

(Assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

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 como pesquisador responsável, concordo em participar no estudo “Avaliação da expressão gênica do inflamassoma e de citocinas da inflamação em indivíduos com anemia falciforme e úlceras de membro inferior”, como voluntário(a). Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Local e data

Assinatura do (a) participante

Impressão Digital

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

| | |
|-------------|-------------|
| Nome: | Nome: |
| Assinatura: | Assinatura: |

ANEXO C: Regras de submissão do periódico

1. Instructions to Authors

Once the submission materials have been prepared in accordance with the author guidelines, new submissions should be made online via the Research Exchange submission portal: <https://wiley.atyponrex.com/journal/BJH>. Please do not submit items in PDF or any other non-editable formats as this will delay publication of your paper.

Please pay particular attention to ensure tables within documents are not pasted as images. Where possible, files should be combined and artwork embedded in the main manuscript file to aid users in downloading and viewing papers.

You may check the status of your submission at any time by logging on to submission.wiley.com and clicking the "My Submissions" button. For technical help with the submission system, please review [Wiley's Research Exchange Author Help Documents](#) or contact submissionhelp@wiley.com.

We strongly encourage all authors contributing to provide an ORCID iD during submission, but we require an ORCID iD for the corresponding author as a minimum and for multiple region submissions for at least one author in each region/institution. This is to enable the manuscript progressing through the handling and review process. You can learn more about ORCID and find out how to obtain one if you do not have one already here: [Distinguish Yourself with ORCID | Wiley](#).

Editorial correspondence should be sent to *BJHaem* Office bjhaem@wiley.com

2. Submission of Papers

The *British Journal of Haematology* invites manuscripts in the field of haematology including clinical, laboratory and experimental haematology.

Authors are invited to submit a pre-submission enquiry if they are uncertain whether their work falls within the general scope of the journal. Pre-submission enquiries should contain a cover letter and an Abstract of the manuscript. Whole manuscripts are not accepted. We ask that you submit your pre-submission enquiry via email to bjhaem@wiley.com. If approved you will need to complete the full submission process including submitting the abstract the cover letter again as part of the submission. Authors whose papers are not deemed suitable for *BJHaem* are usually offered the opportunity to resubmit the paper directly to our online journal *eJHaem*.

Free Format Submission

British Journal of Haematology offers free format submission for a simplified and streamlined submission process.

When you submit, you will need:

- Your manuscript — this should be an editable file including text, figures, and tables, or separate files — whichever you prefer. All required sections should be contained in your manuscript, including abstract, introduction, methods, results,

and conclusions. Figures and tables should have legends and should also be in editable format. Figures should be uploaded in the highest resolution possible. If the figures are not of sufficiently high quality your manuscript may be delayed. References may be submitted in any style or format, as long as it is consistent throughout the manuscript. Supporting information should be submitted in separate files. If the manuscript, figures or tables are difficult for you to read, they will also be difficult for the editors and reviewers, and the editorial office will send it back to you for revision. Ensure your manuscript includes the following:

- An ORCID ID for at least the corresponding author, freely available at <https://orcid.org>
- The title page of the manuscript
- Your co-author details, including affiliation and email address
- data availability statement
- funding statement (failure to declare all funding sources at submission may result in your article not being indexed in line with funder mandates)
- conflict of interest disclosure
- ethics approval statement
- patient consent statement
- permission to reproduce material from other sources
- clinical trial registration

Rapid Review of Manuscripts Submitted Previously to Another Journal

As stated in the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication" (<http://www.icmje.org>; Updated February 2006): "If the manuscript has been submitted previously to another journal, it is helpful to include the previous editor's and reviewers' comments with the submitted manuscript, along with the authors' responses to those comments. Editors encourage authors to submit these previous communications, and doing so it expedites the review process."

For manuscripts previously submitted to other journals with an impact factor of 15 or greater, the authors should include the previous editors' and reviewers' comments along with their point-by-point responses, and the *British Journal of Haematology* will guarantee a rapid (within a week) in-house assessment, with three possible outcomes:

- a. Acceptance or acceptance with minor changes (no additional external reviews needed);
- b. Rejection;
- c. Additional external review is needed; in this case, the authors will have the possibility of accepting the additional external review or withdrawing the manuscript;

- d. When submitting a paper for Rapid Review, please be sure to answer the question regarding rapid review in the affirmative, upload a Word document containing the previous review comments, and your detailed responses to the reviewers' concerns as "Author Response";
- e. Please provide a cover letter indicating that your submission is a rapid review, and from where your submission was previously submitted. The cover letter should also include the previous decision letter received from the previous journal.

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to log into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS), they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at: http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. Services are arranged and paid for by the author. Use of one of these services does not guarantee preference or acceptance for publication.

Ethical policy and guidelines

BJHaem encourages its contributors and reviewers to adopt the standards of the [International Committee of Medical Journal Editors](#). *BJHaem* will not consider papers that have been submitted to, accepted for publication or published elsewhere. Copies of existing manuscripts with potentially overlapping or duplicative material should be submitted together with the manuscript, so that the Editors can judge suitability for publication. The Editors reserve the right to reject a paper on ethical grounds.

Disclosure and competing interests statement

All authors must disclose competing interests, or state "none" via the Journal's submission website.

Competing interests

Authors are required to disclose financial interests in any company or institution that might benefit from their publication. A competing interest exists when a primary interest (such as patients' welfare or the validity of research) might be influenced by a secondary interest (such as financial gain or personal rivalry).

Financial interests have the greatest potential to influence the objectivity, integrity or perceived value of a publication. They may include, but are not limited to, the following:

- **Personal financial interests:** Stocks or shares in companies that may gain or lose financially through publication; consultant fees or fees from speakers bureaus other forms of remuneration from organisations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication.

- **Funding:** Research support from organisations that might gain or lose financially through publication of the paper.
- **Employment:** Recent, present or anticipated employment of you or a family member by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper. Any such competing interest that authors may have should be declared. The aim of the statement is not to eradicate competing interests, as they are almost inevitable. Papers will not be rejected because there is a competing interest, but a declaration on whether or not there are competing interests will be added to the paper.
- **Patent rights**
- **Consultancy work.**

Sources of funding must be disclosed in the Acknowledgments section of the paper. List governmental, industrial, charitable, philanthropic and/or personal sources of funding used for the studies described in the manuscript.

Examples:

- This work was supported by a grant from the National Institutes of Health, USA (DKxxxx to AB).
- This work was supported by the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (grant to AB and CD).
- This work was supported by a grant from Big Pharma Inc. (to AB) and equipment was donated by Small Pharma Inc. EF received a graduate studentship award from the University of xxxxx.

For papers where there are no competing interests, authors must include the statement 'Competing interests: the authors have no competing interests.'

Conflict of Interest statement

For all article types authors should provide a conflict of interest statement detailing any relevant conflicts. If there are none authors should simply state 'no conflicts of interest declared'.

Data availability statement

This journal expects data sharing. Please review [Wiley's Data Sharing policy](#) for more information.

Please review [Wiley's Data Citation policy](#) for more information on how to cite your data.

3. Authorship

All authors must fulfil the following criteria:

- Substantial contributions to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data,

- Drafting the paper or revising it critically,
- Approval of the submitted and final versions.

In the Acknowledgments section of the paper all authors, must indicate their specific contributions to the work described in the manuscript. Some examples include:

- X performed the research
- Y designed the research study
- Z contributed essential reagents or tools
- A analysed the data
- B wrote the paper.

An author may list more than one contribution, and more than one author may have contributed to the same element of the work. e.g. 'A performed the research, A and X analysed the data and wrote the paper, Z contributed the knockout mice for the study and Y designed the research study and wrote the paper'.

Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

You may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or Open Access under the terms of a Creative Commons License.

Standard [re-use and licensing rights](#) vary by journal. Note that [certain funders](#) mandate a particular type of CC license be used. This journal uses the CC-BY [Creative Commons License](#).

Self-Archiving Definitions and Policies: note that the journal's standard copyright agreement allows for [self-archiving](#) of different versions of the article under specific conditions

Open access

You will have the option to make your article open access after acceptance, which will be subject to an Article Publication Charge (APC) unless a waiver applies. Read more about APCs [here](#).

4. General manuscript style and format

Title page

Please see a sample of the title page that you can [follow here](#).

Reference Style

This journal uses Vancouver reference style. Review our [reference style guidelines](#) prior to submission.

Scientific notation

SI units should be used throughout. Human DNA, gene, protein, and DNA restriction and modification enzyme nomenclature should be standardized as follows:

1. Human genes and alleles should be italicized capitals;
2. Gene names should be those recommended by the Nomenclature Committee of the Human Genome Project. Fusion genes should be shown as *BCR::ABL1* not *BCR-ABL1*. This advice also applies to juxtapositions such as *IGH::IL3* where there is no fusion protein. The double colon can also be italicised.
3. Human protein designations are the same as the gene symbol (i.e., written in upper case), but not italicised;
4. When distinguishing between mRNA, genomic DNA and cDNA, the relevant term should be given after the gene symbol, e.g. BCL2 cDNA;
5. Please follow guidance in www.genenames.org and the [HUGO Gene Nomenclature Committee \(HGNC\) recommendations for the designation of gene fusions | Leukemia \(nature.com\)](http://www.hugobase.org/HUGO-Gene-Nomenclature-Committee/HGNC-recommendations-for-the-designation-of-gene-fusions) Bruford, E.A., Antonescu, C.R., Carroll, A.J. et al. HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) recommendations for the designation of gene fusions. *Leukemia* 35, 3040-3043 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01436-6>

Illustrations – numbering

Illustrations should be referred to in text as, e.g., Figure 2, Figures 2, 4-7, using Arabic numbers. Each illustration should be accompanied by a legend up to 100 characters. Tables should be referred to in the text as Table 1; Table 2 etc..

Wiley will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two issues after publication.

5. Manuscript categories

| Article Type | Description | Format |
|-----------------|---|--|
| Original Papers | This category includes original research in scientific, laboratory and clinical haematology. All papers are subject to peer review. Papers must include new data which have not been published elsewhere. | <p>Word Limit for Main Text 3000 words</p> <p>Word Limit for Abstract/Summary 200 words abstract</p> <p>Character Limit for Running short title 60 characters and space</p> <p>Reference Limit 60</p> <p>Figure & Table Limit (combined) 7 Figure and Table</p> |

| Article Type | Description | Format |
|--|--|---|
| | | total combined. Supplementary data are encouraged. Number of Authors 25 authors Format Papers should be divided into abstract, introduction, methods or materials and methods, including statistical approach, results, discussion, acknowledgements, authorship statement and references. |
| Research Letter | Research letters should cover important observations of value demonstrated by a more limited amount of data covering novel methodologies, therapeutic advances, as well any significant clinical observations, which can be reported in condensed form. Case reports must have significant novelty to warrant inclusion. | Word Limit for Main Text 1500 words Word Limit for Abstract/Summary N/A Character Limit for Running short title N/A Reference Limit 15 Figure & Table Limit (combined) 2 Figure and Table total combined. Supplementary data are encouraged. Number of Authors 20 authors Format Should not include Abstracts and subheadings. |
| Reviews | <u>Majority invited:</u> manuscripts written by experts in the field on a topic of current interest to haematologists; should focus on the contemporary status and key points of the topic (shorter, focused reviews acceptable) | Word Limit for Main Text 5000 words Word Limit for Abstract/Summary 200 words Character Limit for Running short title N/A Reference Limit 120 Number of Authors 5 authors |
| BSH Guidelines & Good Practice Papers | Prepared by the BSH Guideline Committee and are subject to peer review like other submissions. Title must include the wording "British | Word Limit for Main Text 5000 words Word Limit for Abstract/Summary 200 words Character Limit for Running |

| Article Type | Description | Format |
|---|--|--|
| | Society for Haematology Guideline.....” | short title N/A Reference Limit 100 Number of Authors 25 authors Format Title should include the name of the body compiling the guidelines. |
| Other Guidelines & Practices | Guidelines prepared by authoritative bodies other than the BSH. | Word Limit for Main Text 3000 words Word Limit for Abstract/Summary 200 words Character Limit for Running short title N/A Reference Limit 100 Number of Authors 25 authors Format Title should include the name of the body compiling the guidelines. |
| How I Treat | Descriptions of treatment, diagnosis and management of haematological conditions including emergencies; intended to provide a succinct clinical, laboratory and pathological description of the condition followed by a workable formula for its management. | Word Limit for Main Text 3000 words Word Limit for Abstract/Summary 100 words Character Limit for Running short title N/A Reference Limit 60 Figure and table limit combined 10 Figure and Table total combined. Supplementary data are encouraged. Number of Authors 4 authors |
| Wider Perspectives | <i>Invitation only:</i> May cover issues in haematology as it is practiced worldwide or in specialist areas, local approaches to management, economic considerations, historical developments in the field, historical biographies, | |

| Article Type | Description | Format |
|-------------------------------------|---|--|
| | current challenges, and future prospects. | |
| Letter to the Editor | This format is reserved for correspondence that relates to papers which have recently appeared in the Journal in the past 6 weeks, if it is deemed to bring important additional information to the readers on the subject covered by the original publication. The Editor will invite response from the original authors for publication alongside. These may be published in print and online, or online only at the Editor's discretion. | Word Limit for Main Text 500 words Word Limit for Abstract/Summary 100 words Character Limit for Running short title N/A Reference Limit N/A Figure and table limit combined Up to 1 figure or table may be included. Number of Authors 3 authors Format The paper which is the subject of the manuscript must be referenced in the text and reference list. |
| Response to Letter to Editor | | Word Limit for Main Text 500 words Format Start with "To the Editor" At the top of the papers. |
| In a Nutshell | These papers provide a short, authoritative, condensed summary on a focused and topical area of haematological knowledge or clinical practice. Their brevity, concise format, and listed take-away points allows the article to be read and assimilated in a much shorter time than the typical review article. The subject should be accessible and relevant for haematologists at all levels of training. Topics may cover clinical practice or mechanistics and science as | Word Limit for Main Text 1000 words Word Limit for Abstract/Summary 1-2 sentence summary Character Limit for Running short title N/A Reference Limit 15 Figure and table limit combined 1 Figure/Visual Abstract Number of Authors 3 authors Format The main body should include a liberal use of headings and 3-5 bullet points. 1-2 sentence conclusion featuring |

| Article Type | Description | Format |
|------------------------------|--|---|
| | it relates to disease and its treatment. | take-away points. Provide at least 1 or 2 comprehensive recent reviews that allow access to a wider source of references. Please ensure you begin your manuscript with the words In a Nutshell. |
| Book reviews | Reviews on recently published books of interest to haematologists are welcome. | Word Limit for Main Text 1000 words Word Limit for Abstract/Summary N/A Character Limit for Running short title N/A Reference Limit 15 Figure and table limit combined No Figure or Table permitted Number of Authors 2 authors Format The main body should include a liberal use of headings and 3-5 bullet points. 1-2 sentence conclusion featuring take-away points. Provide at least 1 or 2 comprehensive recent reviews that allow access to a wider source of references. Format These are now published in the journal but are by invitation of the editor only. No Subheadings |
| Images in Haematology | Authors can submit for consideration an illustration (or, where appropriate, two or more related images) which is/are interesting, instructive and visually attractive, with a short explanatory text. Images in Haematology is | Word Limit for Main Text 350 words Word Limit for Abstract/Summary N/A Character Limit for Running short title N/A Reference Limit 15 Figure and table limit |

| Article Type | Description | Format |
|---------------------|---|--|
| | published in colour without charge. | <p>combined The images (e.g. a clinical photograph, radiology, cytology, histology, a laboratory test) should be submitted in a digital format online. There are no figure numbers or legends, images being referred to by their position on the page if there is more than one.</p> <p>Number of Authors 6 authors – If more than 3 authors, outline the contribution of each author that justifies their inclusion.</p> <p>Format The main body should include a liberal use of headings and 3-5 bullet points.</p> <p>1-2 sentence conclusion featuring take-away points.</p> <p>Provide at least 1 or 2 comprehensive recent reviews that allow access to a wider source of references.</p> <p>Format 1 page only</p> |
| Commentaries | <p><u>Invitation only.</u> Commentaries will be invited on papers published in a current issue of BJHaem. The commentary should summarise the relevant background to the topic of the paper, briefly describe the paper putting it in the perspective of current knowledge. The quality, novelty and limitation of the current paper can be discussed together with opinion of the author who will be an expert in the field.</p> | <p>Word Limit for Main Text 1000 words</p> <p>Word Limit for Abstract/Summary 2-3 sentence summary of the paper you are commenting on.</p> <p>Character Limit for Running short title N/A</p> <p>Reference Limit 10</p> <p>Figure and table limit combined Descriptive figures or tables are encouraged</p> <p>Number of Authors 1-3 authors</p> <p>Format The main body should include a liberal use of headings and 3-5 bullet points.</p> <p>1-2 sentence conclusion featuring</p> |

| Article Type | Description | Format |
|--------------|-------------|---|
| | | <p>take-away points.</p> <p>Provide at least 1 or 2 comprehensive recent reviews that allow access to a wider source of references.</p> <p>Format Title should be brief and likely to attract the readers' attention; it should not include the words 'commentary on' nor reiterate the title of the paper under discussion. After author's affiliations insert 'Commentary on first author, title and pending references'. Final references will be updated by the production team. The paper which is the subject of the commentary should be introduced following the format "In this issue xxx et al...." and the paper included in the references. Supplementary data not permitted.</p> |

Plain Language Summaries

This journal does not accept Plain Language Summaries.

Writing your article title

For more guidance on how to decide on an interesting and eye-catching title for your piece we encourage you to review this guidance from our publishers: [What Makes a Good Research Article Title? \(wiley.com\)](#).

Visual abstracts and video content

Authors are welcome to submit visual abstracts and/or video abstracts or summaries to support their paper. All items will be subject to editorial review and will appear alongside your published article. Please note you will not receive a copy of your supporting information to review so you must ensure you submit the final version. Please remember you are responsible for scientific accuracy and ensuring you have obtained all necessary permissions.

Please see this page for useful information on preparing your supporting information and for details on the file formats and sizes required: [How to Prepare Supporting Information for Your Article | Wiley](#).

Supporting information must be submitted alongside your revised manuscript (after the

first round of revision). This will enable you to base your material on the likely final version of your manuscript and will save unnecessary editing work, but will ensure we can publish this alongside your article on the day it is published.

Please submit your content via email to bjhaem@wiley.com Please ensure all items are clearly labelled with the name of your manuscript and the name of the corresponding author.

Important requirements for social media promotion

From March 2023 we will have a social media presence for the journal on X and LinkedIn. Social media is a crucial way to generate visibility for your article and we hope you will be pleased to support us by providing some additional information that will help with promotion of your work.

Authors of original papers and reviews are now asked to provide the following:

- A 200 word post summary of your paper;
- X handles for all authors (if available and if you wish to share them);
- A visual abstract (this will be requested only following initial peer review or at acceptance).

Further details on preparing a visual abstract can be found below. There are also some external companies that can assist with the production of these; one example is the [Graphical Abstract Maker](#).

The visual abstract is a one single-panel image that is designed to give readers an immediate understanding of the take-home message of the paper. Its intent is to encourage browsing, promote interdisciplinary scholarship, and help readers quickly identify which papers are most relevant to their research interests.

The Visual Abstract is meant to represent one key aspect of the results.

The Visual Abstract can be a single image and can contain multiple panels.

To prepare the image, select an image or graphic that is easy to read and, as much as possible, devoid of cluttering items, and that conveys clear, non-speculative, visual information of the findings.

Labels, while useful, must be kept to a minimum.

The image should be provided in one of the following height and width configurations: 400 x 300 pixel, 300 x 400 pixel, or 400 x 400 pixel, and at a maximal resolution of 300 dpi.

Please use Arial or Helvetica font with a size of 10-12 points; preferred file types are EPS and TIFF.