

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

LETÍCIA BINHARA MUSIAL

**RELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E HEMÓLISE COM A
MUTAÇÃO EM GATA-1 NA DOENÇA FALCIFORME**

PONTA GROSSA

2024

LETÍCIA BINHARA MUSIAL

**RELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E HEMÓLISE COM A
MUTAÇÃO EM GATA-1 NA DOENÇA FALCIFORME**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Fisiologia e Fisiopatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Cristyane Kalva.

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Ribeiro Cruz.

PONTA GROSSA

2024

M987 Musial, Letícia Binhara
Relação entre os marcadores de inflamação e hemólise com a mutação em GATA-1 na doença falciforme / Letícia Binhara Musial. Ponta Grossa, 2024.
69 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Fisiologia e Fisiopatologia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Cristyane Kalva.
Coorientador: Prof. Dr. Bruno Ribeiro Cruz.

1. Sistema - grupo sanguíneo Duffy. 2. Interleucina-8. 3. Interleucina-1beta. 4. Proteína C-reativa. 5. Lactato desidrogenase. I. Kalva, Danielle Cristyane. II. Cruz, Bruno Ribeiro. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fisiologia e Fisiopatologia. IV.T.

CDD: 610.28

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA 02/2024 DA LETÍCIA BINHARA MUSIAL, REALIZADA NO DIA 09 DE MAIO DE 2024, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos nove dias do mês de maio do ano de dois mil e vinte quatro, às 09h00min, em formato híbrido, na sala 115 do bloco M da UEPG e através do sistema de webconferência da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) via plataforma GoogleMeet – NUTEAD/UEPG, em sessão pública, sob a presidência da **Profa. Dra. Danielle Cristyane Kalva** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestrand **LETÍCIA BINHARA MUSIAL** na linha de pesquisa “**Fisiopatologia do metabolismo e do sistema imune**”, constituída pelas demais Doutoradas (membros titulares): **Profa. Dra. Jeane Eliete Laguilha Visentainer - Universidade Estadual de Maringá (UEM)** e **Profa. Dra. Iriane Eger - DEBIO/UEPG**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: “**RELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E HEMÓLISE COM A MUTAÇÃO EM GATA-1 NA DOENÇA FALCIFORME**”. Encerrada a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como **aprovada**. Considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, a aluna deverá entregar uma cópia da versão final, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao Colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Alteração de título:

Sugestão:

Documento assinado digitalmente
 DANIELLE CRISTYANE KALVA
Data: 12/05/2024 19:21:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Danielle Cristyane Kalva – Orientadora - UEPG

Documento assinado digitalmente
 BRUNO RIBEIRO CRUZ
Data: 19/05/2024 19:58:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Bruno Ribeiro Cruz – Coorientador – UEPG

Documento assinado digitalmente
 JEANE ELIETE LAGUILHA VISENTAINER
Data: 14/05/2024 15:47:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Jeane Eliete Laguilha Visentainer – UEM - Membro titular externo à UEPG

Documento assinado digitalmente
 IRIANE EGER
Data: 15/05/2024 09:06:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Iriane Eger – UEPG – Membro titular interno.

Ponta Grossa, 09 de maio de 2024.

*Aos meus pais, Janete e Eduardo. Ao meu
irmão, Elisson. E ao meu noivo, Vinicius.*

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Nossa Senhora das Graças por todas as bênçãos e graças concedidas.

À minha mãe Janete, por todo o amor, apoio e incentivo; por ser minha base e caminhar sempre ao meu lado e por me ensinar as coisas mais importantes da vida.

Ao meu pai Eduardo (*in memorium*), pelo amor, incentivo e por olhar por mim a cada dia.

Ao meu irmão Elisson, pela parceria de sempre, por me estimular a ser melhor e por todo apoio e ajuda.

Ao meu noivo Vinicius, por todo apoio, amor e paciência; por cada incentivo e ajuda nesse período, você foi essencial.

Aos meus orientadores Danielle e Bruno, por todos os ensinamentos, pelo incentivo e por aceitarem me orientar nesse trabalho, vocês são muito importantes na minha trajetória.

À Caroline Luise Prochaska, pela parceria no projeto de pesquisa e pela ajuda na coleta das amostras e dos dados utilizados no trabalho.

Às Doutoradas Cláudia Santos Lorenzato e Cilmara Cristina Kuwahara Dumke, por aceitarem participar da pesquisa e por auxiliarem na convocação dos pacientes e coleta das amostras utilizadas no trabalho.

Ao professor José Carlos Rebuglio Velloso, por disponibilizar o seu laboratório para realização de algumas análises.

À Larissa Glugoski, por toda ajuda e ensinamentos desde o meu TCC, parte dos meus conhecimentos em biologia molecular eu devo a você.

Ao Raylan Golinski Costa, pelo auxílio na coleta dos dados utilizados no trabalho.

Às professoras Mariane de Faria Moss e Iriane Eger, por aceitarem compor a minha banca de qualificação do mestrado e por todas as contribuições que tornaram meu trabalho melhor.

Aos meus amigos da Pós-Graduação, por todo ânimo e incentivo que me deram, vocês tornaram esse período mais fácil e divertido.

À minha gata Moana, pela companhia e carinho em todo esse período.

À Capes pela bolsa concedida no período do mestrado, tornando possível a realização desse trabalho.

Minha gratidão a todos!

“Se você tem conhecimento, deixe os outros acenderem suas velas nele.”

(Margaret Fuller)

RESUMO

A doença falciforme é caracterizada por mutações presentes no gene codificante da β -globina, contendo pelo menos um alelo β^s que, quando em homozigose, identifica a anemia falciforme (HbSS). A fisiopatologia da doença falciforme tem início com a polimerização e despolimerização da HbS, processo responsável pelas primeiras alterações na membrana do eritrócito. A partir disso, uma série de moléculas e células são recrutadas, expressas e ativadas, tanto na membrana das hemácias quanto em células endoteliais e na circulação, gerando uma cascata de reações e eventos responsáveis pela instauração de um processo inflamatório crônico. Um fator que pode interferir nesse processo inflamatório é o fenótipo Duffy nulo. Esse fenótipo é resultado de uma mutação pontual no box do promotor eritroide GATA-1, que leva ao silenciamento da expressão do antígeno Fy^b na superfície da hemácia que, quando presente, atua como um receptor para quimiocinas pró-inflamatórias, participando da modulação da resposta inflamatória. Dessa maneira, o presente trabalho buscou identificar a influência da mutação em GATA-1 no processo inflamatório de indivíduos falciformes. Foi realizada a genotipagem para os alelos *FY*01*, *FY*02* e *FY*02N.01* em amostras de indivíduos falciformes e de doadores de sangue saudáveis, além da dosagem da proteína C reativa (PCR), interleucina-8 (IL-8) e interleucina-1 β (IL-1 β) como marcadores de inflamação, e da lactato desidrogenase (LDH) como marcador de hemólise. Os resultados demonstraram que o alelo mutado *FY*02N.01* é encontrado com uma frequência quase duas vezes maior em indivíduos falciformes do que em indivíduos sem a doença. Em relação aos marcadores de inflamação e hemólise, a PCR, IL-8 e LDH apresentaram diferença significativa entre falciformes e doadores, sendo os níveis mais altos encontrados no primeiro grupo. Não foi identificada diferença estatística nos níveis de IL-1 β entre os grupos. O uso de hidroxiureia pelos indivíduos falciformes não demonstrou interferência nos níveis das interleucinas analisadas, sendo identificada diferença apenas nos níveis de PCR e LDH com o uso do medicamento. A mutação em GATA-1 em homozigose apresentou influência apenas sobre os níveis de IL-8 nos indivíduos falciformes. A partir desses resultados conclui-se que os indivíduos falciformes apresentam uma inflamação crônica, mesmo quando estáveis clinicamente, e a presença do alelo mutado pode levar ao aumento dos níveis séricos de IL-8, contribuindo para a manutenção do processo inflamatório nesses indivíduos.

Palavras-chave: Doença da Hemoglobina S, Sistema do Grupo Sanguíneo Duffy, interleucina-8, interleucina-1 β , proteína C-reativa, lactato desidrogenase.

ABSTRACT

Sickle cell disease is characterized by mutations present in the β -globin gene, containing at least one β^s allele which, when in homozygosity, identifies sickle cell anemia (HbSS). The pathophysiology of sickle cell disease begins with the polymerization and depolymerization of HbS, a process responsible for the initial changes in the erythrocyte membrane. Subsequently, a series of molecules and cells are recruited, expressed, and activated, both in the red blood cell membrane and in endothelial cells and circulation, generating a cascade of reactions and events responsible for the establishment of a chronic inflammatory process. One factor that may interfere with this inflammatory process, is the Duffy null phenotype. This phenotype results from a point mutation in the GATA-1 erythroid promoter box, leading to the silencing of Fy^b antigen expression on the erythrocyte surface, which, when present, acts as a receptor for pro-inflammatory chemokines, participating in the modulation of the inflammatory response. Thus, the present study aimed to identify the influence of the GATA-1 mutation on the inflammatory process of sickle cell individuals. Genotyping was performed for the *FY*01*, *FY*02*, and *FY*02N.01* alleles in samples from sickle cell individuals and healthy blood donors, in addition to measuring C-reactive protein (CRP), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-1 β (IL-1 β) as inflammation markers, and lactate dehydrogenase (LDH) as a marker of hemolysis. The results showed that the mutated allele *FY*02N.01* is found at a frequency almost twice higher in sickle cell individuals than in individuals without the disease. Regarding inflammation and hemolysis markers, CRP, IL-8 and LDH presented significant differences between sickle cell individuals and donors, with the highest levels found in the former group. No statistical difference was identified in the levels of IL-1 β between the groups. The use of hydroxyurea by sickle cell disease patients did not show interference in the levels of the analyzed interleukins, with differences only identified in the levels of CRP and LDH with the medication's use. The GATA-1 mutation in homozygosity seemed to have an influence only on IL-8 levels in sickle cell individuals. From these results, it is concluded that sickle cell individuals present chronic inflammation, even when clinically stable, and the presence of the mutated allele may lead to increased serum levels of IL-8, contributing to the maintenance of the inflammatory process in these individuals.

Keywords: Sickle Cell Disease, Duffy Blood Group System, phenotype, genotype, interleukin-8, interleukin-1 β , C-reactive protein, lactate dehydrogenase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema mutação em GATA-1.	28
Figura 2 - Fluxograma de extração dos DNAs.	34
Figura 3 - Fluxograma procedimento de dosagem IL-8.....	38
Figura 4 - Fluxograma procedimento de dosagem IL-1 β	39
Figura 5 - Eletroforese de fragmentos amplificados para identificação do alelo <i>FY*02</i>	43
Figura 6 - Níveis de PCR encontrados nos indivíduos falciformes com e sem uso de hidroxiureia.....	52
Figura 7 - Níveis de LDH em indivíduos falciformes com e sem o uso de hidroxiureia.	53
Figura 8 - Níveis de IL-8 séricos nos indivíduos falciformes de acordo com o genótipo.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados na genotipagem.	35
Tabela 2 - Caracterização da população de estudo.	41
Tabela 3 - Frequência antigênica de Fy ^a e Fy ^b nos grupos estudados.	43
Tabela 4 - Genótipo da população total de pacientes falciformes e doadores.	44
Tabela 5 - Frequência dos alelos <i>FY*01</i> , <i>FY*02</i> e <i>FY*02N.01</i> na população total analisada.	45
Tabela 6 - Casos de divergência entre fenotipagem e genotipagem na população total analisada.	46
Tabela 7 - Caracterização dos grupos para as análises laboratoriais.	47
Tabela 8 - Dosagem dos marcadores de inflamação e hemólise nos indivíduos falciformes e doadores analisados.	48
Tabela 9 - Marcadores de inflamação e hemólise nos indivíduos falciformes considerando o uso de hidroxiureia.	50
Tabela 10 - Marcadores de inflamação e hemólise nos doadores de sangue de acordo com o genótipo.	54
Tabela 11 - Marcadores de inflamação e hemólise nos indivíduos falciformes de acordo com o genótipo.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACKR1	Receptor Atípico de Quimiocinas do tipo 1 (<i>Atypical Chemokine Receptor 1</i>)
ASC	Proteínas adaptadoras apoptóticas ligadas a um domínio de recrutamento e ativação de caspase (<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
ATPases	Adenosinatrifosfatases
BCAM-1/Lu	moléculas de adesão celular basal-1/Lutheran
CARD	Domínio de recrutamento e ativação de caspase (<i>Caspase activation and recruitment domain</i>)
COX	Ciclooxigenase
PCR	Proteína C Reativa
PCR-SSP	Reação em Cadeia de Polimerase-Sequência Específica de Primers
PCR-US	Proteína C Reativa-Ultrassensível
DAMP	Padrão molecular associado ao dano (<i>Danger associated molecular pattern</i>)
DARC	<i>Duffy Antigen Receptor for Chemokines</i>
DBP	Proteína de ligação ao Duffy
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
Fy ^{es}	Eritrócito silencioso
gDNA	DNA genômico
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina tipo Adulto, Hemoglobina A
HbAA	Hemoglobina de duas subunidades do tipo Adulto
HbAS	Hemoglobina com uma subunidade tipo Adulto e uma subunidade tipo S
HbF	Hemoglobina Fetal
HbH	Hemoglobina tipo H
HbS	Hemoglobina tipo S
HbSC	Hemoglobina com uma subunidade do tipo S e uma subunidade do tipo C
HbSS	Hemoglobina com duas subunidades do tipo S
HEMEPAR	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
HU	Hidroxiuréia
IAP	Proteína associada a integrina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
ICAM-4	Molécula de adesão intercelular-4
IFN γ	Interferon γ
IL-1	Interleucina-1
IL-12	Interleucina-12
IL-17	Interleucina-17

IL-18	Interleucina-18
IL-18R	Receptor da interleucina-18
IL-1R1	Receptor de IL-1 do tipo 1
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
LDH	Desidrogenase láctica
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MIP-1 β /CCL4	Proteína inflamatória de macrófagos-1 β
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NF- κ B	Fator Nuclear-kappa B
NK	Linfócitos <i>Natural Killer</i>
NLRC4	Receptor do tipo NOD contendo um domínio de ativação de caspase 4
NLRP1	Receptor do tipo NOD contendo um domínio de pirina 1
NLRP3	Receptor do tipo NOD contendo um domínio de pirina 3
NLRs	Receptores do tipo NOD
pb	Pares de base nitrogenada
PCR-SSP	Reação em cadeia de polimerase-sequência específica de primers
PGE ₂	Prostaglandina E2
PIGF	Fator do crescimento placentário
POP	Procedimento Operacional Padrão
RANTES	Regulated on activation, normal T expressed and secreted
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
sPLA2	Enzima fosfolipase A2 secretora
Th17	Células T helper do tipo 17
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
VE	Vesículas extracelulares
VEFG	Fator de crescimento do endotélio vascular
VWF	Fator de Von Willebrand
XO	Xantina Oxidase

LISTA DE SÍMBOLOS

Cl	Cloro
$\cdot\text{OH}$	Radical Hidroxila
Fe^{2+}	Ferro no estado ferroso
Fe^{3+}	Ferro no estado férrico
H^+	Hídron (cátion hidrogênio)
H_2O	Molécula de água
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
$\text{HbFe}^{2+}\text{O}_2$	Hemoglobina ligada ao Oxigênio
HbFe^{3+}	Metahemoglobina
K	Potássio
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
NO	Óxido Nítrico
NO^+	Nitrosônio
NO_2^-	Íon nitrito
NO_3^-	Nitrato
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Ânion superóxido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.2 DOENÇA FALCIFORME.....	17
2.1.1 Distribuição, epidemiologia e impacto econômico da doença falciforme.....	18
2.3 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA FALCIFORME.....	19
2.4 MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E HEMÓLISE.....	24
2.5 O ANTÍGENO DUFFY NA DOENÇA FALCIFORME.....	26
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 GRUPOS DE ESTUDO E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO/EXCLUSÃO.....	32
4.2 COLETA DAS AMOSTRAS.....	32
4.3 COLETA DOS DADOS DEMOGRÁFICOS, USO DE HIDROXIUREIA E FENOTIPAGEM DUFFY.....	33
4.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	33
4.4.1 Extração do DNA.....	33
4.4.2 Quantificação do DNA.....	34
4.5 AMPLIFICAÇÃO DOS ALELOS DE INTERESSE UTILIZANDO PCR-SSP.....	35
4.6 REVELAÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS UTILIZANDO ELETROFORESE.....	36
4.7 DOSAGEM DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E HEMÓLISE.....	36
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO TOTAL DO ESTUDO.....	41
5.2 GENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO TOTAL DO ESTUDO.....	43
5.3 DIVERGÊNCIA ENTRE A FENOTIPAGEM E A GENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO TOTAL DE ESTUDO.....	46
5.4 SELEÇÃO DOS GRUPOS PARA A DOSAGEM DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E HEMÓLISE.....	47
5.5 DOSAGEM DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E HEMÓLISE.....	48
4 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias são as doenças monogênicas mais comuns no mundo, estima-se que 7% da população mundial carrega um gene alterado relacionado a uma hemoglobinopatia, sendo as talassemias e a doença falciforme as mais comuns e de maior gravidade (Mamas et al., 2022; Williams; Weatherall, 2012). A doença falciforme é caracterizada pela mutação no gene codificante da β -globina, que leva a pelo menos um alelo β^s e formação da hemoglobina S (HbS) que, quando em homozigose, identifica a anemia falciforme (Kato et al., 2018).

Estima-se que, no Brasil, mais de 200.000 crianças nascem com traço ou anemia falciforme a cada ano, necessitando de assistência médica e medicamentos ao longo de toda a vida, além do tratamento de crises agudas e complicações crônicas. Ainda sem cura, os cuidados com a doença falciforme têm impacto na economia do país, sendo destinados mais de 20 milhões de dólares apenas para o tratamento de crises vaso-oclusivas em crianças e adultos (Brasil, 2012; Silva-Pinto et al., 2022).

Devido ao impacto na qualidade de vida dos pacientes e na economia dos países, a doença falciforme vem sendo cada vez mais estudada, com o intuito de elucidar completamente a sua fisiopatologia e desenvolver tratamentos mais eficazes. Com o avanço nessa área de pesquisa, sabe-se que a inflamação crônica e as crises vaso-oclusivas são os responsáveis pela clínica da doença. A inflamação está diretamente ligada a hemólise e liberação do conteúdo das hemácias na circulação. A partir disso, ocorrem diversas reações que desencadeiam a expressão de moléculas de adesão e liberação de citocinas pró-inflamatórias, moléculas que estão diretamente envolvidas com o processo inflamatório crônico e a vaso-oclusão nesses indivíduos (Nader et al., 2020).

Dentre as citocinas liberadas nesse processo, identificam-se as interleucinas 1β , 6, 8 e 18 (IL- 1β , IL-6, IL-8 e IL-18), além do fator de necrose tumoral α (TNF- α), como os principais responsáveis pela sinalização na inflamação. As interleucinas 1β e 18 são ativadas, principalmente, por meio do inflamassoma, complexo de proteínas responsável também pelo início da morte celular programada (Man et al., 2017). A IL-6, apesar de elevada na doença falciforme, é inespecífica e está presente em diferentes processos inflamatórios, podendo atuar tanto como uma citocina pró-

inflamatória, quanto anti-inflamatória (Kaur et al., 2020). A IL-8, por sua vez, está envolvida principalmente na ativação de plaquetas devido a sua ação pró-coagulante, influenciando assim em crises vaso-oclusivas. Nesse processo está incluso também o TNF- α , que tem seu mecanismo de ação bem elucidado, levando a ativação do endotélio com indução da expressão de moléculas de adesão (Bester; Pretorius, 2016; Dworkis et al., 2011).

Assim, as citocinas IL-1 β , IL-8 e IL-18 têm forte atuação na inflamação aguda e crônica, mas não tem seu papel ou importância completamente elucidada na doença falciforme, sendo necessários mais estudos acerca dessa relação. Ainda, existem outros fatores que podem interferir no processo inflamatório que ocorre nessa doença, como o fenótipo Duffy nulo, caracterizado pela ausência do antígeno Duffy, um importante receptor de quimiocinas, na superfície das hemácias.

O antígeno Duffy, conhecido como ACKR1 (*Atypical Chemokine Receptor 1*), é uma glicoproteína de membrana presente nas hemácias, que atua como um receptor para quimiocinas pró-inflamatórias, se ligando e removendo ou liberando essas quimiocinas na circulação, e assim participando da modulação da resposta inflamatória. Quando essa glicoproteína não é expressa nas hemácias, como no caso do fenótipo Duffy nulo, as citocinas pró-inflamatórias tendem a ficar aumentadas, influenciando no processo inflamatório (Höher et al., 2018).

O fenótipo Duffy nulo é resultado de uma mutação pontual no box do promotor eritroide GATA-1, presente no alelo codificador do antígeno de grupo sanguíneo Duffy B (Fy^b). Quando essa mutação está presente, ocorre o silenciamento da expressão do antígeno Fy^b na superfície da hemácia e, quando em homozigose, leva ao fenótipo chamado Duffy nulo. Por ser uma mutação encontrada em indivíduos de origem negroide, assim como a HbS, não é incomum o encontro de indivíduos negros apresentando ambas as mutações (Davis et al., 2015; Lopez et al., 2015).

Observando esses fatores, identifica-se a relevância da pesquisa pela mutação em GATA-1, principalmente em indivíduos cronicamente inflamados, como é o caso dos pacientes falciformes, que sofrem com crises inflamatórias e vaso-oclusivas como parte importante do curso da doença. Além disso, os parâmetros inflamatórios tendem a ser ainda mais aumentados nos indivíduos falciformes que possuem a mutação em GATA-1, sendo interessante a identificação de possíveis marcadores inflamatórios importantes.

Dessa maneira, o presente trabalho buscou identificar a influência da mutação em GATA-1 no processo inflamatório de indivíduos falciformes, por meio da genotipagem sanguínea e da dosagem de marcadores de inflamação e hemólise que indiquem a intensidade das reações inflamatórias nesses indivíduos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2 DOENÇA FALCIFORME

O termo doença falciforme é utilizado para definir as doenças hereditárias que ocorrem como resultado de mutações no gene codificante da β -globina (*HBB*), subunidade que compõe a hemoglobina A (HbA), forma normal e mais abundante em adultos, e que é formada por quatro subunidades de globina, sendo duas subunidades α e duas subunidades β . De acordo com a mutação existente, é caracterizada a doença falciforme, sendo necessário que ambos os alelos do gene *HBB* estejam mutados e, ao menos um dos alelos mutados seja β^s . Assim, a presença de apenas um alelo β^s caracteriza o traço falciforme (HbAS), mas não a doença, enquanto a mutação em homozigose para β^s define a anemia falciforme (HbSS). Dessa maneira, o termo doença falciforme abrange, além da anemia falciforme, as outras condições geradas pela presença da HbS em conjunto com outras variantes da hemoglobina, como a HbSC e a HbS/ β -talassemia (Kato et al., 2018; Pauling et al., 1949; Piel et al., 2017).

A mutação pontual da hemoglobina leva à troca de um ácido glutâmico, de característica hidrofílica, por uma valina, que apresenta característica hidrofóbica, na posição 6 da cadeia de β -globina madura ($\beta^{6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}}$) (Kato et al., 2018; Saah et al., 2022). Assim, quando não está ligada ao oxigênio, a HbS expõe as porções hidrofóbicas que tendem a formar ligações entre si, levando ao agrupamento de diferentes tetrâmeros que iniciam a nucleação do polímero de HbS. Esse processo ocorre rapidamente dentro da hemácia, formando longas fibras polimerizadas, as quais são responsáveis pela rigidez e distorção da membrana do eritrócito (Bunn, 1997; Sundd et al., 2019). Essa alteração do formato e flexibilidade da membrana das hemácias, caracteriza a chamada hemácia falciforme, que dá o nome à doença. A frequente alteração do formato da membrana pode prejudicar as hemácias, tornando a conformação falciforme irreversível e determinando a gravidade da doença, além de reduzir seu tempo de vida e levar ao desenvolvimento de uma anemia hemolítica (Manwani; Frenette, 2013; Toledo et al., 2019).

Nesse sentido, sabe-se que a hemácia falciforme é instável e sofre diversas alterações na sua membrana e citosol, alterando assim o estado redox da célula, bem

como suas propriedades reológicas. Essas características levam a uma destruição precoce da célula, tanto por hemólise extravascular por meio da fagocitose macrofágica, que ocorre em maior proporção, quanto por hemólise intravascular (Alayash et al., 2018; Kato et al. 2018). Na literatura é descrita uma redução de 50 a 85% no tempo de vida da hemácia falciforme, totalizando em média 31,9 dias de célula viável circulante no indivíduo (Quinn et al., 2016).

2.1.1 Distribuição, epidemiologia e impacto econômico da doença falciforme

A doença falciforme é mais frequentemente encontrada na África, em regiões de epidemia e endemia de malária, fator que levou à identificação de uma proteção por parte da HbS contra essa doença. A polimerização da hemoglobina nos indivíduos falciformes torna a infecção por *Plasmodium spp* inviável, uma vez que esse parasita utiliza da digestão da hemoglobina para sua sobrevivência. Além disso, as modificações na membrana do eritrócito também dificultam a invasão dessas células pelo parasita. Devido a isso, a frequência da HbS tende a ser maior em indivíduos de origem africana e declarados pretos, não apenas nesse, mas também em outros continentes, como na América (Archer et al., 2023; Piel et al., 2010; Santos et al., 2022).

Estima-se que, em 2010, nasceram no mundo pouco mais de 310.000 indivíduos homocigotos SS, isto é, apresentando anemia falciforme (HbSS), e quase 5.500.000 heterocigotos AS, ou seja, com traço falciforme (HbAS) (Piel et al., 2013a). No mesmo ano, outro estudo de Piel e colaboradores indicou uma média estimada de 305.800 recém-nascidos com anemia falciforme por ano no mundo, apontando um aumento estimado em um terço até 2050 (aproximadamente 404.200 nascimentos). Ainda, o estudo calcula que entre 2010 e 2050 cerca de 14.242.000 dos nascidos no período, serão portadores de anemia falciforme (Piel et al., 2013b).

De acordo com o Ministério da Saúde, aproximadamente 3.000 crianças nascem com doença falciforme e 200.000 com traço falciforme, por ano, no Brasil. Assim, a incidência do traço falciforme é de 1 a cada 35 nascidos vivos no país, enquanto no Paraná, 1 a cada 13.500 nascidos vivos apresenta a doença falciforme, e 1 a cada 65 apresenta o traço falciforme (Brasil, 2012).

Quanto à expectativa de vida, é demonstrado que os indivíduos falciformes vivem em média até os 54 anos, enquanto indivíduos que não têm a doença apresentam uma expectativa de vida média de 80 anos (Lubeck et al., 2019). Também, é demonstrado que, entre 2000 e 2018, 9.817 mortes tiveram causa relacionada a doença falciforme no Brasil, sendo informadas em 70,5% delas como causa principal da morte, e nos outros 29,5%, como causa associada. Em relação a faixa etária, 82,6% das mortes ocorreram antes dos 50 anos, compreendendo 52% antes dos 30 anos, 27,5% antes dos 18 anos, e 10,4% das mortes ocorrendo antes dos 5 anos de idade (Santo, 2022).

Esses dados impactam diretamente nos custos do tratamento e manejo do paciente falciforme, uma vez que na maioria dos casos eles utilizam de medicamentos, como hidroxiuréia, antibióticos e quelantes de ferro, e/ou transfusões de sangue ao longo de toda a vida, além do tratamento de complicações agudas e crônicas. É estimado que 400 milhões de dólares são gastos por ano no manejo de indivíduos falciformes no Brasil, sendo a crise vaso-oclusiva a complicação que implica o maior gasto em adultos (aproximadamente 11,4 milhões de dólares) e em crianças (aproximadamente 11,5 milhões de dólares) a cada ano (Silva-Pinto et al., 2022).

2.3 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA FALCIFORME

As alterações morfológicas das hemácias dão início a fisiopatologia da doença, que se inicia com a polimerização e despolimerização da HbS e consequente alteração da membrana do eritrócito, prejudicando alguns canais iônicos, como os cotransportadores K-Cl, e reduzindo a hidratação celular. O eritrócito também passa a expressar moléculas de adesão e estruturas de ligação como a fosfatidilserina, normalmente internalizada, além da fosfatidiletanolamina, moléculas de adesão celular basal-1/Lutheran (BCAM-1/Lu), proteína associada a integrina (IAP) e molécula de adesão intercelular-4 (ICAM-4). A expressão dessas estruturas aumenta a capacidade de adesão dos eritrócitos entre si e com outras células e moléculas, bem como contribui para a hemólise e ativação do endotélio (Kato et al., 2018; Saah et al., 2022; Sundd et al., 2019).

A partir da hemólise instaura-se um processo de anemia, levando a uma maior produção e liberação de hemácias na corrente sanguínea, incluindo os reticulócitos, os quais expressam $\alpha 4\beta 1$ integrina e CD36, outras moléculas de adesão (Kaul et al., 2009; Sundd et al., 2019). Assim, mais do que a própria morfologia da hemácia falciforme, que devido a sua rigidez pode obstruir micro vasos, a adesão das hemácias falcizadas ao endotélio vascular, bem como a ligação de outras células como leucócitos e plaquetas nesse conjunto, mediadas por moléculas de adesão já citadas anteriormente, levam à vaso-occlusão (Darbari et al., 2020).

Entre as moléculas de adesão envolvidas nesse processo está inclusa também a P-selectina, presente na superfície da membrana das células endoteliais, onde induz a adesão de leucócitos, e na superfície da membrana das plaquetas, mediando sua ligação aos neutrófilos, ambos os processos interferindo na formação de agregados (Darbari et al., 2020). A E-selectina também possui papel importante na ligação dos neutrófilos ao endotélio, bem como transmite sinais para ativação da integrina Mac-1, a qual dá início à crise vaso-oclusiva aguda e possivelmente letal (Zhang et al., 2016). Outras moléculas de adesão endotelial também fazem parte da adesão dos eritrócitos ao endotélio ativado, como a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e o fator de Von Willebrand (VWF), contribuindo para os episódios vaso-oclusivos (An et al., 2023).

A hemólise intra e extravascular das hemácias falcizadas pode levar a uma anemia crônica com valores de Hb entre 6 e 11g/dL, e importante liberação da hemoglobina e do heme, tanto diretamente no plasma, como na forma de micropartículas (Kato et al., 2018; Sundd et al., 2019). Essas micropartículas são chamadas de vesículas extracelulares (VEs) e compreendem tanto exossomas, quanto microvesículas. Na doença falciforme as VEs podem ser originadas, além das hemácias, de leucócitos, plaquetas e células endoteliais, sendo as derivadas de hemácias, as mais abundantes. Essas, têm grande expressão de fosfatidilserina na superfície e podem carregar hemoglobina, heme ou microRNAs (Vinchi, 2023).

Em relação aos produtos da hemólise, o heme e a hemina, produto da degradação da metahemoglobina, são capazes de ativar neutrófilos e induzir a liberação de armadilhas extracelulares (*neutrophil extracellular traps*, NETs), que são formados por cromatina descondensada e proteínas, como a mieloperoxidase. Os

NETs induzem a ativação endotelial, com consequente disfunção do endotélio (Nader et al., 2020).

Ainda, o heme tanto livre, quanto carregado e liberado pelas VEs, quando em contato com as células endoteliais, leva ao aumento da expressão de células de adesão por diversos meios, entre eles a ativação da via de sinalização do receptor do tipo Toll 4 (TLR4), que atua ativando o fator de transcrição pró-inflamatório NF- κ B (Fator Nuclear-kappa B), desencadeando a produção das citocinas e moléculas de adesão VCAM-1, P-selectina, E-selectina, fator tecidual, interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) (Belcher et al., 2014). Essa via também leva a formação de espécies reativas de oxigênio, com consequente inflamação vascular seguida de dano e ativação endotelial, e estimula a degranulação do corpo de Weibel-Palade, levando a liberação do VWF na superfície celular e possivelmente resultando em um episódio vaso-oclusivo (An et al., 2023; Kucukal et al., 2018).

Os episódios vaso-oclusivos na doença falciforme ocorrem em micro vasos, e levam a lesão por isquemia e reperfusão dos vasos atingidos. Quando ocorre a isquemia, isto é, a redução do fluxo sanguíneo, é ativado o metabolismo anaeróbio com produção de ácido láctico. Isso leva a acidose intracelular seguida da redução dos níveis de ATP, com a inativação das ATPases e excesso de cálcio intracelular. Essas condições induzem a conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase, que dá início a produção de $O_2^{\cdot-}$ (radical ânion superóxido) e H_2O_2 (peróxido de Hidrogênio), responsáveis pela oxidação de moléculas e inativação de enzimas, desencadeando um estímulo pró-inflamatório, com liberação de citocinas, modificação da expressão das moléculas de adesão e redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). Esses estímulos sinalizam para o recrutamento de células da imunidade inata e adaptativa, bem como levam a ativação do endotélio, seguida da ativação e convocação de leucócitos, plaquetas e do sistema complemento (Ansari; Gavins, 2019; Hebbel et al., 2020).

Em relação ao outro principal produto da hemólise, a hemoglobina ligada ao oxigênio (oxiemoglobina) liberada, reage com o óxido nítrico endotelial, levando a formação de nitrato, de forma rápida e irreversível (Sundd et al., 2019). Ainda, a desoxiemoglobina, isto é, a hemoglobina sem ligação ao oxigênio, também liberada na hemólise e formada na primeira reação, sofre nitrosilação em contato com o NO. Essa cadeia de reações leva ao consumo de até 3 moléculas de NO para cada

subunidade de Hb, diminuindo a biodisponibilidade de NO e, conseqüentemente, afetando a vasodilatação dependente dessa molécula, podendo levar à vasoconstrição sistêmica, pulmonar e vascular (Buehler et al., 2020).

A hemoglobina livre também induz a formação de espécies reativas de oxigênio, principalmente por meio da autoxidação, que ocorre cerca de duas vezes mais rápido na HbS do que na HbA, devido à maior instabilidade da primeira. A autoxidação leva à formação de espécies reativas como o $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 , o $\cdot OH$ (radical hidroxila) e produtos da oxidação de lipídios, com consecutiva liberação do heme e perda do átomo de ferro, os quais têm potencial de intensificar as reações oxidativas (Vona et al., 2021).

Ainda em relação ao estresse oxidativo, que se refere ao desequilíbrio na proporção entre as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (EROs e ERNs), com a atividade ou concentração de moléculas antioxidantes, existem diversas reações que levam ao aumento dessas espécies reativas no indivíduo falciforme, como o aumento da atividade da xantina oxidase endotelial (XO), já mencionado como forte produtor de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , e da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase, a maior enzima produtora do ânion superóxido (Silva; Faustino, 2023; Vona et al., 2021).

Além disso, a reação da hemoglobina com o peróxido de hidrogênio também tem papel importante. Essa interação leva a formação de $\cdot OH$ e metahemoglobina ($HbFe^{3+}$), por meio da reação de Fenton, em que o Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} (estado férrico), o que impede a ligação do oxigênio (O_2). Também, na hemoglobina parcialmente oxidada, essa reação altera a conformação do heme, aumentando sua afinidade pelo oxigênio. Dessa maneira, além da metahemoglobina não conseguir se ligar ao O_2 , ela também não consegue liberar o oxigênio já ligado, para os tecidos. Não bastassem esses prejuízos, a metahemoglobina é posteriormente degradada em hemeina, molécula conhecida pelo seu padrão molecular associado ao dano (DAMP), que afeta de forma importante as hemácias (Nascimento et al., 2008; Silva; Faustino, 2023).

As DAMPs, como o heme, a hemeina e as EROs, têm papel importante no quadro inflamatório do indivíduo falciforme, uma vez que induzem a resposta inflamatória por meio da ativação de receptores de imunidade inata, como os receptores do tipo NOD (NLRs), que contém um domínio de pirina (NLRP1 e NLRP3)

ou um domínio de ativação da caspase (NLRC4), presentes em leucócitos, no plasma e no líquido intersticial. Esses receptores levam à ativação do inflamassoma, um complexo citosólico de proteínas que compreende principalmente algumas enzimas caspases inflamatórias (de Freitas Dutra et al., 2022; Martinon et al., 2002). As enzimas do inflamassoma são responsáveis pela ativação da gasdermina-D, molécula que dá início a piroptose (morte celular programada inflamatória), e pela clivagem e liberação das IL-1 β e IL-18. Com a morte e liberação do conteúdo celular, são também liberadas as proteínas ASC (do inglês *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD - caspase activation and recruitment domain*), as quais sinalizam para ativação de novos inflamassomas, assim propagando e intensificando a inflamação (Man et al., 2017).

A IL-1 β , por meio da sua ligação ao receptor de IL-1 do tipo 1 (IL-1R1), presente em células epiteliais e hematopoiéticas, leva a uma cascata de reações, que induzem a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, a liberação de quimiocinas, com conseqüente captação de células inflamatórias pelas células estromais, e a liberação de prostaglandina E2 (PGE₂) e de NO, mediadores inflamatórios que atuam de forma local e sistêmica. Essa interleucina, juntamente com outras citocinas, atua também na produção das células T helper do tipo 17 (Th17), e na sua diferenciação, com a produção da interleucina-17 (IL-17) (Gabay et al., 2010; Yazdi; Ghoreschi, 2016). A IL-17, apesar de não ter seu papel bem elucidado na doença falciforme, interfere na agregação plaquetária e conseqüente trombose (Pitanga et al., 2013). O estudo de Bouchnita e colaboradores (2017), demonstrou que a presença da IL-17 aumentou a taxa de agregação plaquetária de 20% para 45 a 50% e que, quando em conjunto com TNF- α , esse efeito é ainda maior devido a intensa expressão de fator tecidual e ativação da cascata da coagulação.

A IL-18, após a ligação ao seu receptor IL-18R, presente principalmente em células T ativadas (CD4⁺ e CD8⁺) e em linfócitos natural killer (NK), desencadeia uma cascata de reações, semelhante a que ocorre na sinalização da IL-1 β , levando a produção de interferon γ (IFN γ), que viabiliza a resposta imune do tipo 1 por meio da ativação de linfócitos T. Também, é apontado que a IL-18 tem a capacidade de ativar neutrófilos (Landy et al., 2024; Yazdi; Ghoreschi, 2016).

Além disso, a ativação de receptores principalmente em monócitos, via DAMPs e via fator do crescimento placentário (PIGF), da família dos fatores de

crescimento do endotélio vascular (VEFG) que é liberado sob estímulo da eritropoetina durante a eritropoiese aumentada, intensificam a expressão das citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-8, TNF- α , proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e proteína inflamatória de macrófagos-1 β (MIP-1 β /CCL4) (Kalra et al., 2018; Zhang et al., 2016).

O TNF- α atua ativando as células endoteliais e aumentando a produção e expressão das proteínas de adesão VCAM-1 e ICAM-1, dessa maneira, contribuindo para o processo de vaso-oclusão (Dworkis et al., 2011). Enquanto o MCP-1, após ligação ao seu receptor, amplia o processo inflamatório por meio da ativação e diferenciação de linfócitos e células NK, auxílio na permeação de macrófagos e neutrófilos, e por meio da promoção da angiogênese (Li et al., 2024).

Por fim, a IL-8, que possui afinidade com diferentes receptores, atua na ativação de neutrófilos e nas plaquetas. Assim, a sua ligação seguida da ativação plaquetária demonstra sua atividade pró-coagulante, com atuação em diferentes níveis da coagulação. Ainda, tem sido demonstrado o papel da IL-8 na apoptose (morte celular programada), por meio da cicloxigenase (COX) e PGE₂, e na eriptose (morte celular programada de eritrócitos), a última com mecanismo ainda não completamente elucidado (Bester; Pretorius, 2016; Domingos et al., 2020).

Todos esses processos de sinalização e estímulos desde a hemólise, formação de espécies reativas de oxigênio e liberação de citocinas pró-inflamatórias, levam a vaso-oclusão, disfunção endotelial e estresse oxidativo, favorecendo e gerando o quadro inflamatório crônico no indivíduo falciforme (Nader et al., 2020; Sundd et al. 2019).

2.4 MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E HEMÓLISE

A doença falciforme, como descrito anteriormente, é responsável pela instauração de um processo inflamatório crônico que afeta todo o organismo do indivíduo, em que os principais eventos e indicadores inflamatórios estão relacionados ao aumento da contagem de leucócitos, da ativação e expressão de moléculas de adesão nos leucócitos, aumento nos níveis das citocinas pró e anti-inflamatórias, dos NETs, da enzima fosfolipase A2 secretora (sPLA2), do PEGF, do leucotrieno E4 urinário e da proteína C reativa (PCR) (Toledo et al., 2019).

As citocinas pró-inflamatórias mais comumente encontradas em altas concentrações na doença falciforme são o TNF- α , a IL-1, IL-6, IL-8, interleucina-12 (IL-12), IL-17 e IL-18 (Alagbe et al., 2022). Na literatura são encontrados estudos que demonstram níveis significativamente aumentados de TNF- α e IL-6 em indivíduos falciformes quando comparados a indivíduos saudáveis (Bandeira et al., 2014). Também é descrita uma expressão elevada de CD36, IL-6 e IL-8 em crianças e adolescentes falciformes quando comparados a controles saudáveis, sendo os níveis dessas interleucinas ainda maiores durante as crises relacionadas às complicações da doença, como as crises vaso-oclusivas, quando comparados aos pacientes estáveis (Abdul-Hussein et al., 2021).

A inflamação crônica no indivíduo falciforme estável também é marcada por níveis aumentados das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-12 e IFN- γ , sendo o último secretado após o estímulo da IL-18, sugerindo também o aumento nos níveis dessa interleucina (Silva-Junior et al., 2021). Nesse sentido, são descritos níveis aumentados de IL-18 e IL-8 em crianças falciformes estáveis, em comparação a crianças saudáveis (Wagdy et al., 2024). Os autores também evidenciaram que a IL-18 pode ser utilizada como fator de risco e progressão da cardiomiopatia relacionada à doença falciforme.

Assim, as citocinas podem estar relacionadas com as manifestações e desfecho clínico dos pacientes falciformes. Na mesma linha da pesquisa de Wagdy, o estudo de Gupta e colaboradores (2021), identificou associação entre os níveis aumentados da IL-18 e o desenvolvimento de cardiomiopatia e arritmia ventricular em ratos com doença falciforme. Enquanto o estudo de Domingos e colaboradores (2020), demonstrou que a IL-6, que tem sua liberação ativada pela IL-1 β , e a IL-8, estão associadas com um mau prognóstico no indivíduo falciforme.

Em 2008, Adam e colaboradores identificaram a proteína C reativa como um marcador inflamatório da anemia falciforme, verificando pacientes HbSS com níveis maiores desse marcador em comparação aos indivíduos HbAS e HbAA. Em 2020, Zahran e colaboradores avaliaram o impacto do tratamento com hidroxíureia nos níveis dos marcadores inflamatórios TNF- α , IL-6, IL-8 e PCR, em 35 crianças falciformes e 20 controles saudáveis. Os autores observaram que os níveis séricos normais dos pacientes falciformes eram maiores quando comparados aos controles, e o uso de hidroxíureia, apesar de reduzir os níveis de IL-6 e TNF- α circulantes, não foi suficiente para igualar aos níveis verificados nos controles.

Com relação aos marcadores de hemólise na doença falciforme, estes compreendem principalmente a contagem de reticulócitos, a bilirrubina sérica, a lactato desidrogenase (LDH), o heme livre, a hemoglobina livre, e a hemopexina e a haptoglobina séricas. As últimas são proteínas de ligação ao heme e hemoglobina, respectivamente, que auxiliam na proteção contra os danos causados por essas moléculas (Olatunya et al., 2019).

Os níveis da LDH são aumentados em indivíduos falciformes devido a hemólise e dano tecidual causados pela fisiopatologia da doença, podendo estar ainda mais elevados durante as crises vaso-oclusivas (Ballas, 2013). No estudo de Kato e colaboradores (2006), o LDH é indicado como um marcador de hemólise relacionado a disfunção endotelial que está relacionado a manifestações clínicas como a hipertensão pulmonar, úlceras cutâneas de perna, priapismo, e até risco de morte, sugerindo o uso desse marcador hemolítico também como um indicador do prognóstico do indivíduo falciforme.

2.5 O ANTÍGENO DUFFY NA DOENÇA FALCIFORME

As hemácias também podem se ligar e/ou liberar moléculas inflamatórias e sinalizadoras, como as quimiocinas, fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias, além de algumas citocinas anti-inflamatórias, dessa maneira desempenhando papel importante na modulação dos níveis das citocinas presentes na circulação (Karsten et al., 2018). Uma das principais e mais conhecidas proteínas de membrana do eritrócito que atua na ligação e remoção de citocinas da circulação é o antígeno Duffy, descrito como sequestrador de quimiocinas (Karsten; Herbert, 2020).

O antígeno Duffy, é uma glicoproteína que atravessa 7 vezes a membrana da hemácia e apresenta um domínio intracelular (porção C-terminal) e um domínio extracelular (porção N-terminal), sendo assim capaz de se ligar em citocinas e atuar removendo ou liberando quimiocinas na circulação e, conseqüentemente, fazendo parte da modulação da inflamação. Previamente conhecido como DARC (*Duffy Antigen Receptor for Chemokines*), e atualmente denominado ACKR1 (*Atypical Chemokine Receptor 1*), esse receptor é capaz de se ligar a quimiocinas das classes C-X-C (quimiocinas de inflamação aguda), como a IL-8, e C-C (quimiocinas de

inflamação crônica), como o RANTES (*regulated on activation, normal T expressed and secreted*) e a MCP-1 (Maheshwari; Killeen, 2023; Höher et al., 2018).

A porção N-terminal longa e com muitos aminoácidos confere ao ACKR1 a possibilidade de configurações variáveis dessa região, atribuindo assim a capacidade de afinidade, interação e ligação às diferentes classes de quimiocinas (Crawford; Volkman, 2023). Esse receptor é expresso em quatro tipos de células: nos eritrócitos, onde funciona como um tampão de quimiocinas por meio da sua ligação e/ou armazenamento dessas moléculas; nos eritroblastos, onde auxilia na manutenção da homeostase das células hematopoiéticas; nas células endoteliais das vênulas, onde é responsável pela ligação, armazenamento e transporte das quimiocinas para dentro das células e auxilia na migração dos leucócitos para os tecidos; e nas células de Purkinje do cerebelo e outros neurônios, onde contribui para a função fisiológica das células (Samus; Rot, 2024). Dessa maneira, a principal atuação desse receptor é na manutenção dos níveis homeostáticos das quimiocinas circulantes por meio da interação e internalização, seguida da degranulação dessas moléculas, com consequente perda/diminuição da sinalização inflamatória (Jenkins et al., 2019).

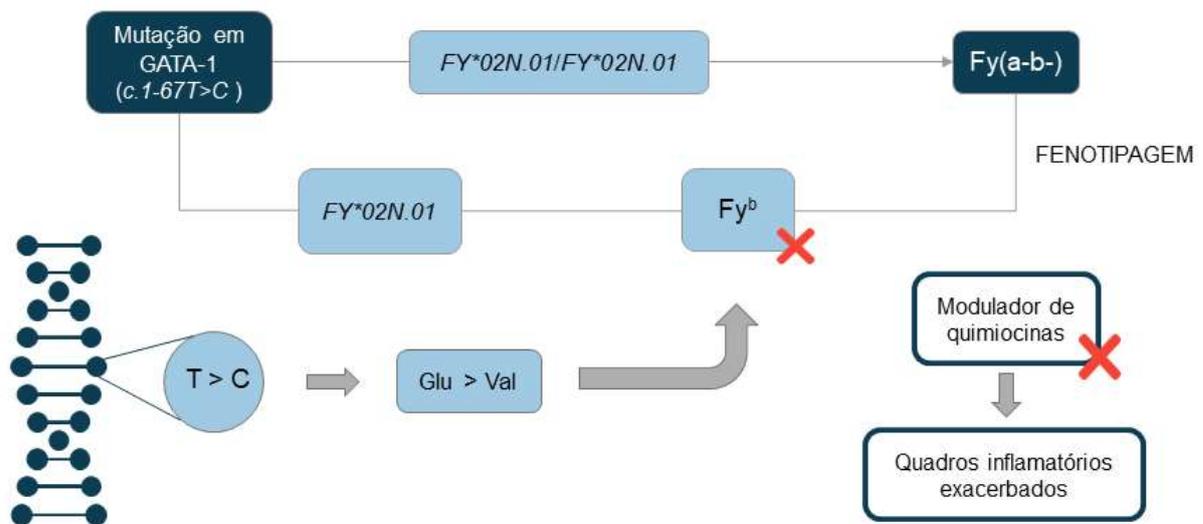
A glicoproteína transmembrana ACKR1 é codificada pelo gene *ACKR1*, localizado no cromossomo 1, na região 1q22-23 (Rappoport et al., 2019; Tournamille et al., 1995). Esse gene é responsável pela transcrição de duas isoformas, A e B, sendo a isoforma B a principal, uma vez que codifica a proteína de 336 aminoácidos expressa nas células de linhagem eritroide, a partir de dois alelos codominantes, resultando nos antígenos de grupo sanguíneo Duffy (Davis et al., 2015; Höher et al., 2018).

Os alelos *FY*01 (FY*A)* e *FY*02 (FY*B)* codificam os antígenos Fy^a e Fy^b , respectivamente. Os dois alelos se diferenciam por um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) em que no alelo *FY*01*, a base nitrogenada de número 125 é uma guanina, enquanto no alelo *FY*02*, esse nucleotídeo é substituído por uma adenina (c.125G>A). Isso leva à codificação de dois aminoácidos diferentes na segunda posição do códon 42, sendo o Fy^a formado por um resíduo de glicina, e o Fy^b formado por um resíduo de ácido aspártico. Os alelos codominantes podem dar origem a três genótipos distintos *FY*01/FY*01*, *FY*02/FY*02* e *FY*01/FY*02*, em que a sua codificação leva aos fenótipos $Fy(a+b-)$, $Fy(a-b+)$ e $Fy(a+b+)$, respectivamente, no

eritrócito (Crawford; Volkman, 2023; Höher et al., 2018; Rappoport et al., 2019; Tournamille et al., 1995).

Existem também outros fenótipos do antígeno Duffy, que contemplam variantes e fenótipos nulos, desencadeados por diferentes mutações tanto no alelo *FY*A*, quanto no alelo *FY*B*. Nesse grupo existe um fenótipo importante, o Fy(a-b-), resultante da mutação pontual c.1-67T>C no box do promotor eritroide GATA-1 no alelo *FY*B*, em homozigose. Essa mutação, por afetar o sítio de ligação do fator de transcrição eritroide GATA-1, leva ao silenciamento da expressão do antígeno Fy^b apenas no eritrócito que, por esse motivo, é chamado de eritrócito silencioso (Fy^{es}) ou Duffy nulo, e representado pelo genótipo *FY*02N.01* (Davis et al., 2015; Lopez et al., 2015; Tournamille et al., 1995). Um esquema demonstrando a mutação em GATA-1 e seu efeito na fenotipagem Duffy está representado abaixo (Figura 1).

Figura 1 - Esquema mutação em GATA-1.



A mutação no fator de transcrição eritroide GATA-1, codificada pelo alelo *FY*02N.01*, quando em homozigose (*FY*02N.01/FY*02N.01*), leva ao silenciamento do antígeno Fy^b apenas na superfície das hemácias que, na fenotipagem são identificadas com o fenótipo Duffy nulo. Fy^b, antígeno Duffy B. Fy^{es}, Duffy nulo ("eritrócito silencioso"). T, timina. C, citosina. Glu, ácido glutâmico. Val, valina. Fy(a-b-), fenótipo Duffy nulo. *FY*02N.01*, alelo codificante do antígeno Duffy B mutado em GATA-1.

Fonte: A autora.

A distribuição dos alelos Duffy é heterogênea ao redor do mundo. Já é estabelecido que as maiores frequências do alelo *FY*02N.01* são encontradas na África subsaariana, com uma frequência de mais de 90% para este alelo, enquanto o alelo *FY*A* é encontrado com uma frequência de aproximadamente 80% em países do sul asiático e na Austrália, e com uma frequência média de 50% no restante do

mundo. O alelo *FY*B* é encontrado com a menor frequência entre os três alelos, sendo encontrado principalmente em países com grande heterogeneidade alélica, em especial nas Américas, onde todos os alelos estão presentes, e existe a predominância alélica em regiões geográficas específicas (Howes et al., 2011).

No Brasil, devido à grande miscigenação, os três alelos são encontrados, com predominância do alelo mutado em indivíduos de descendência africana, como demonstrado por Waskow e colaboradores (2020), que encontraram o alelo *FY*02N.01* em 40,8% dos indivíduos afro-brasileiros testados, enquanto apenas 7,6% dos indivíduos euro-brasileiros testados apresentaram tal alelo. No Paraná, Guelsin e colaboradores (2010), identificaram que 22% dos indivíduos testados apresentam ao menos um alelo mutado.

O fenótipo Duffy nulo, resultante da homozigose para o alelo *FY*02N.01*, é conhecido pela sua proteção contra o *Plasmodium vivax*, parasita humano causador da malária, que utiliza a sua proteína de ligação ao Duffy (DBP) para interagir com o antígeno Duffy presente nas células eritroides, e assim invadi-las e realizar a infecção. Na ausência do receptor para ligação, as hemácias se tornam resistentes à infecção e o indivíduo se torna “imune” a malária causada por *P. vivax*. Essa é a principal razão atribuída a predominância do alelo mutado na África, sendo o Duffy nulo considerado uma forma de evolução e seleção natural (Batchelor et al., 2014; Wertheimer; Barnwell, 1989).

Além disso, tem sido demonstrado que o fenótipo Duffy nulo também apresenta implicação em quadros inflamatórios. O estudo de Mangalmurti e colaboradores (2009), indicou que a transfusão de hemácias sem o antígeno Duffy levou ao aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias, quando comparado à transfusão de hemácias contendo esse antígeno, em ratos. Ainda, Ha e colaboradores (2023), identificaram níveis mais altos de proteína C reativa ultrasensível (PCR-US), marcador de inflamação, em indivíduos negros com genótipo Duffy nulo.

Também, sugere-se associação entre a presença do antígeno Duffy na superfície das hemácias, com níveis reduzidos de interleucina-8 (IL-8) no soro humano (Velásquez et al., 2015), dado que condiz com o encontrado em 2010 por Mecabo e colaboradores, que registraram níveis aumentados de IL-8 em indivíduos falciformes com fenótipo Duffy-negativo. No mesmo estudo, os autores encontraram

níveis aumentados de LDH nesses indivíduos, sugerindo também reações hemolíticas mais intensas relacionadas ao fenótipo nulo.

Em contrapartida, devido ao efeito do antígeno Duffy de tampão e de manutenção de algumas citocinas na circulação, a sua ausência é capaz de gerar também diminuição dos níveis de algumas citocinas circulantes devido a rápida remoção dessas moléculas da circulação, como é apresentado por Yao e colaboradores (2018), que identificaram menores níveis das citocinas CCL2 e CCL11 em mulheres de ancestralidade africana identificadas com eritrócitos Duffy nulo.

Observando os efeitos já descritos da ausência do antígeno Duffy nos níveis de algumas citocinas e a inflamação crônica como fisiopatologia da doença falciforme, percebe-se que ainda são poucos os estudos que demonstram a relação, ainda não bem definida, entre a presença da mutação e parâmetros de inflamação e hemólise no indivíduo falciforme adulto.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de expressão dos marcadores de inflamação e hemólise, e sua relação com a presença da mutação em GATA-1 em indivíduos falciformes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar indivíduos falciformes com o fenótipo Fy(a-b-) (presença da mutação em GATA-1);
- Avaliar os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-1 β ;
- Avaliar os níveis séricos dos marcadores de inflamação (PCR) e hemólise (LDH);
- Avaliar a influência do uso de hidroxiureia nos níveis séricos dos marcadores de inflamação e hemólise nos indivíduos falciformes;
- Comparar os níveis dos marcadores inflamatórios e de hemólise de indivíduos falciformes com indivíduos não falciformes;
- Avaliar a associação entre os marcadores inflamatórios e de hemólise, com os genótipos Duffy na anemia falciforme

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 GRUPOS DE ESTUDO E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO/EXCLUSÃO

A população de estudo foi formada por indivíduos cadastrados na rede do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR) e divididos em dois grupos, sendo: Um grupo controle, composto por doadores de sangue saudáveis, e um grupo de estudo, composto por pacientes falciformes. Todos os participantes da pesquisa realizaram doação de sangue ou foram atendidos pelo Hemocentro Coordenador de Curitiba. Para ambos os grupos foram incluídos no estudo apenas os indivíduos com idade maior ou igual a 18 anos.

Para o grupo controle foram incluídas as amostras de doadores de sangue aptos à doação e registrados no HEMEPAR. Para o grupo de estudo foram incluídas as amostras dos pacientes falciformes com genótipo HbSS. Foram excluídas do estudo, para ambos os grupos, as amostras coletadas em tubo contendo heparina. Além disso, para o grupo de estudo foram excluídas as amostras coletadas em período coincidente com sinais e/ou sintomas de infecção e/ou reação inflamatória (crise), bem como as amostras coletadas de indivíduos transfundidos em até 1 mês anterior à coleta da amostra.

A avaliação clínica dos pacientes para inclusão no estudo foi realizada pelos médicos hematologistas do ambulatório do HEMEPAR, durante a consulta de rotina dos indivíduos. Já os doadores foram avaliados pelos médicos ou enfermeiros responsáveis pela triagem para doação de sangue, seguindo os critérios necessários para tal.

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas e fenotipadas pelo Hemocentro Coordenador de Curitiba, com posterior encaminhamento à Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) para realização da genotipagem e dosagem das citocinas de interesse.

Foram coletadas amostras de sangue total, em tubo com EDTA, e amostras de soro, em tubo com gel separador, de todos os participantes do estudo. No total

foram obtidas amostras de 95 indivíduos, sendo 37 pacientes falciformes (grupo de estudo) e 58 doadores de sangue (grupo controle).

Após a coleta, as amostras de sangue total foram armazenadas a 4°C antes do seu uso para extração do DNA, por um período de até 15 dias, enquanto as amostras de soro foram congeladas a -30°C até a obtenção de todas as amostras e sua utilização nas dosagens dos marcadores de interesse, compreendendo um período de 5 meses.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CEPESH-SESA/HT sob o parecer N° 6.194.543 e da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) sob o parecer N° 5.555.818. Todos os participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Esta pesquisa foi realizada em conformidade com a Declaração de Helsinki.

4.3 COLETA DOS DADOS DEMOGRÁFICOS, USO DE HIDROXIUREIA E FENOTIPAGEM DUFFY

Os dados demográficos de idade e sexo, foram coletados a partir do cadastro dos pacientes e doadores voluntários no sistema do HEMEPAR (SBS Web). O uso de hidroxureia como parte da terapia dos indivíduos falciformes foi verificada pela farmácia do Hemocentro através do sistema de liberação de medicação excepcional (LME).

A fenotipagem dos antígenos de grupo sanguíneo Duffy (Fy^a e Fy^b) também foi obtida, para os pacientes e doadores, por meio do cadastro desses indivíduos no sistema SBS Web. Esses dados foram utilizados para comparação com a genotipagem e, a partir disso, como auxílio na definição dos alelos apresentados por cada indivíduo.

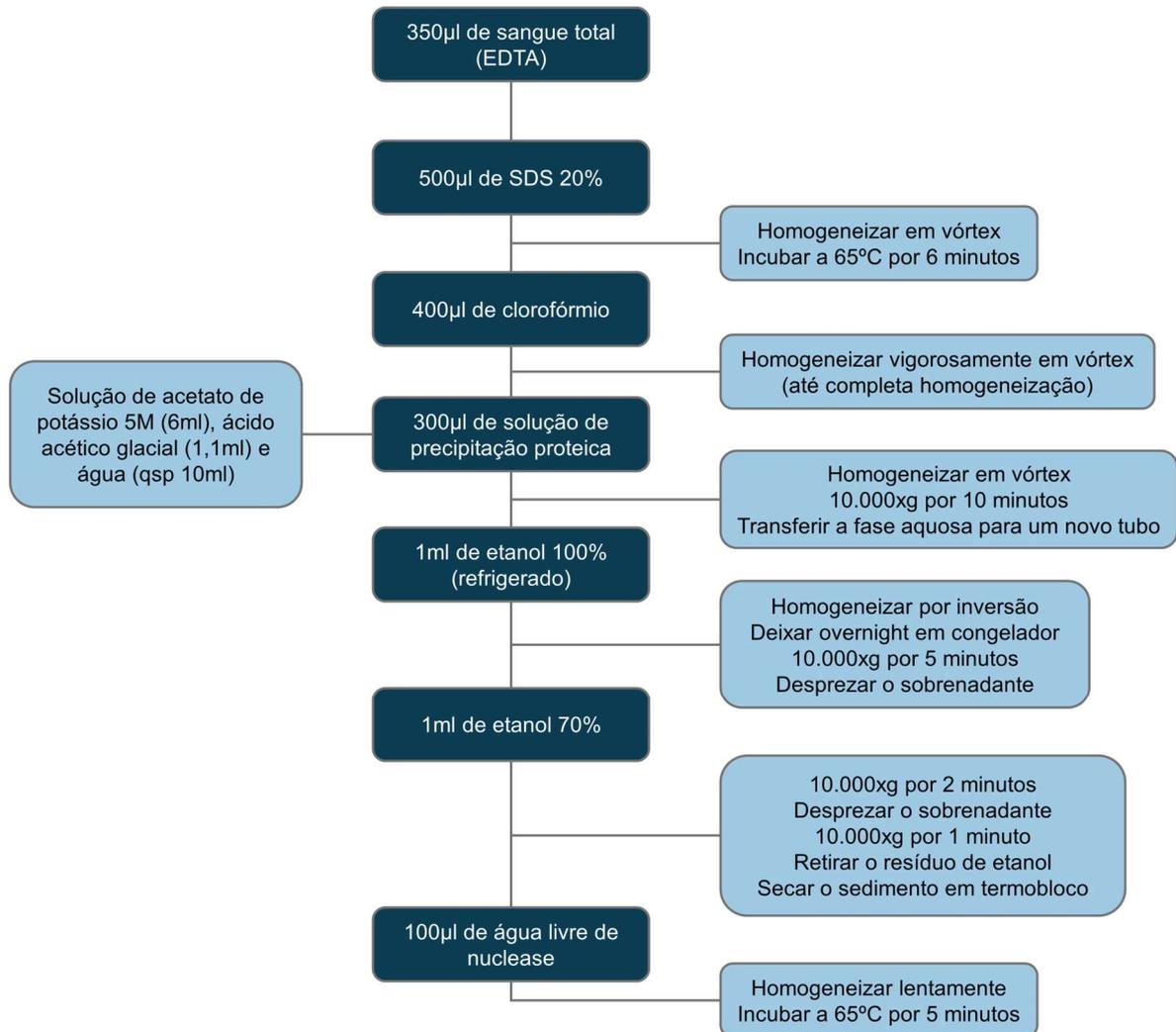
4.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

4.4.1 Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído a partir do sangue total obtido pela coleta de sangue periférico, com EDTA. A técnica de extração de DNA utilizando o dodecil

sulfato de sódio (SDS) foi realizada conforme o protocolo descrito Sambrook e colaboradores (1989) e adaptado por Do Amaral e colaboradores (2012), com modificações. As etapas da extração estão representadas no fluxograma ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma de extração dos DNAs.



Fonte: A autora.

4.4.2 Quantificação do DNA

A concentração e a qualidade do DNA foram analisadas por densidade óptica no aparelho Cirrus 80MB (FEMTO, Brasil), sendo aceitos os DNAs com razão de pureza entre 1,6 e 2,0, a qual é calculada pelo próprio equipamento.

4.5 AMPLIFICAÇÃO DOS ALELOS DE INTERESSE UTILIZANDO PCR-SSP

A reação em cadeia de polimerase-sequência específica de primers (PCR-SSP) foi realizada para a determinação da mutação em GATA-1 (*FY*02N.01*), e dos alelos do gene Duffy (*FY*01*, *FY*02*), utilizando o termociclador Biocycler MJ96G (Biosystems, Brasil). Foram utilizados primers específicos para identificação dos alelos de interesse em cada reação, e em todas as reações realizadas foram adicionados primers para identificação do alelo *HGH*, utilizado como controle interno da reação. As sequências dos primers utilizados estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Primers utilizados na genotipagem.

Alelo	Orientação	Sequência de nucleotídeos	Referências
<i>FY*01</i>	Forward	5'- CAGGAGACTCTTCCGGTGTAAC - 3'	Liu et al., (2012)
	Reverse	5'- CAGCTGCTTCCAGGTTGCCAC - 3'	
<i>FY*02</i>	Forward	5'- CAGGAGACTCTTCCGGTGTAAC - 3'	Liu et al., (2012)
	Reverse	5'- CAGCTGCTTCCAGGTTGCCAT - 3'	
<i>FY*02N.01</i>	Forward	5'- CTCATTAGTCCTTGGCTCTTAC - 3'	Olsson et al., (1998)
	Reverse	5'- CAGCTGCTTCCAGGTTGCCAT - 3'	Liu et al., (2012)
<i>HGH</i>	Forward	5'- TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA - 3'	Gassner et al., (1997)
	Reverse	5'- CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC - 3'	

Fonte: A autora.

Para a reação de amplificação foram utilizadas diferentes concentrações dos reagentes para os alelos *FY*01* e *FY*02*, e para o alelo *FY*02N.01*, ambas com um volume final de 20µl e adição de 40 a 100ng de DNA genômico (gDNA) previamente extraído. As concentrações dos reagentes utilizados em cada reação estão descritas abaixo.

Para a pesquisa dos alelos *FY*01* e *FY*02*, foram utilizados 0,024mM do mix de dNTPs (desoxirribonucleotídeos fosfatados), 0,6U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 1x de tampão PCR-buffer, 1,125mM de MgCl₂, e 0,5µM de cada primer. Para a pesquisa do alelo *FY*02N.01*, foram utilizados 0,024mM do mix de dNTPs, 1U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 1x de tampão

PCR-buffer, 1,5mM de MgCl₂, 0,5μM dos primers do controle interno, e 0,75μM dos primers para *FY*02N.01*.

As etapas da reação de PCR foram conduzidas de acordo com procedimento desenvolvido em laboratório, baseado no procedimento descrito por Liu e colaboradores (2012). As condições para PCR-SSP utilizadas foram uma desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto e 30 segundos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos, com posterior etapa final de alongamento a 72°C por 5 minutos.

4.6 REVELAÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS UTILIZANDO ELETROFORESE

Os fragmentos de interesse amplificados, foram separados de acordo com o número de pares de bases nitrogenadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% com adição de 1μL de revelador GelRED (Biotium) previamente diluído (1:500) e 2μL de azul de bromofenol em cada amostra. Foi utilizado o marcador de peso molecular Invitrogen™ 100pb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Cada corrida foi realizada em cuba de eletroforese com tampão TBE (Tris-borato-EDTA), a 80V por 40 minutos, seguida de revelação em fotodocumentador para eletroforese em gel L-PIX (Loccus, Brasil).

A identificação de cada alelo foi realizada de acordo com o tamanho esperado para cada fragmento, sendo *FY*01* com aproximadamente 170 pares de base nitrogenadas (pb), *FY*02* com aproximadamente 180 pb, *FY*02N.01* com aproximadamente 700 pb, e o controle interno *HGH* com 434 pb.

4.7 DOSAGEM DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E HEMÓLISE

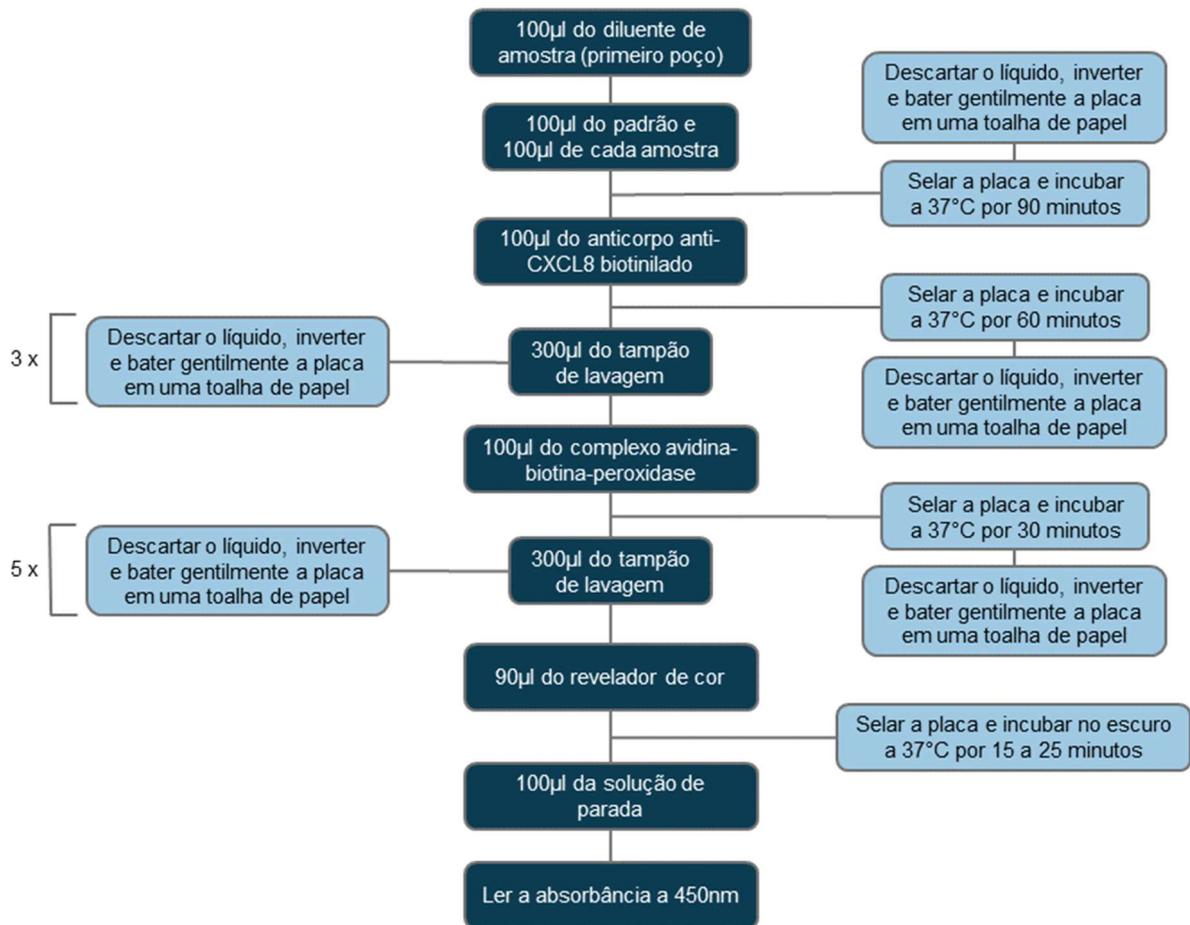
Para avaliação dos marcadores de inflamação e de hemólise entre o grupo dos pacientes falciformes (n=37) e o grupo controle (n=58), foram analisadas as amostras de todos os indivíduos falciformes e selecionados 37 doadores para análise e comparação, sendo que a homogeneização dos grupos foi realizada a partir da idade, sexo e fenótipo deduzido.

Os marcadores utilizados para a identificação da inflamação foram a interleucina-8 (IL-8), a interleucina-1 β (IL-1 β) e a proteína C reativa (PCR), enquanto para identificação da hemólise foi utilizada a lactato desidrogenase (LDH).

A pesquisa da IL-8 foi realizada nas amostras de soro de cada indivíduo selecionado, por meio da técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), utilizado o CXCL8 ELISA kit PicoKine (EK0413, Boster Biological Technology, Wuhan, China). O ensaio foi realizado conforme demonstrado no fluxograma abaixo (Figura 3), e os reagentes e amostras foram previamente descongelados, preparados e mantidos em temperatura ambiente durante o procedimento.

Antes da realização do teste, os reagentes foram preparados da seguinte maneira: o tampão de lavagem foi diluído em uma proporção 1:25 com água destilada, enquanto o anticorpo biotilado anti-CXCL8 humana e o complexo avidina-biotina-peroxidase foram ambos diluídos na proporção 1:100 com seu respectivo diluente. O padrão de CXCL8 humana foi reconstituído com 1ml do diluente de amostras seguido de agitação suave e descanso por 10 minutos antes das diluições. As amostras de soro foram diluídas com seu respectivo diluente, quando necessário.

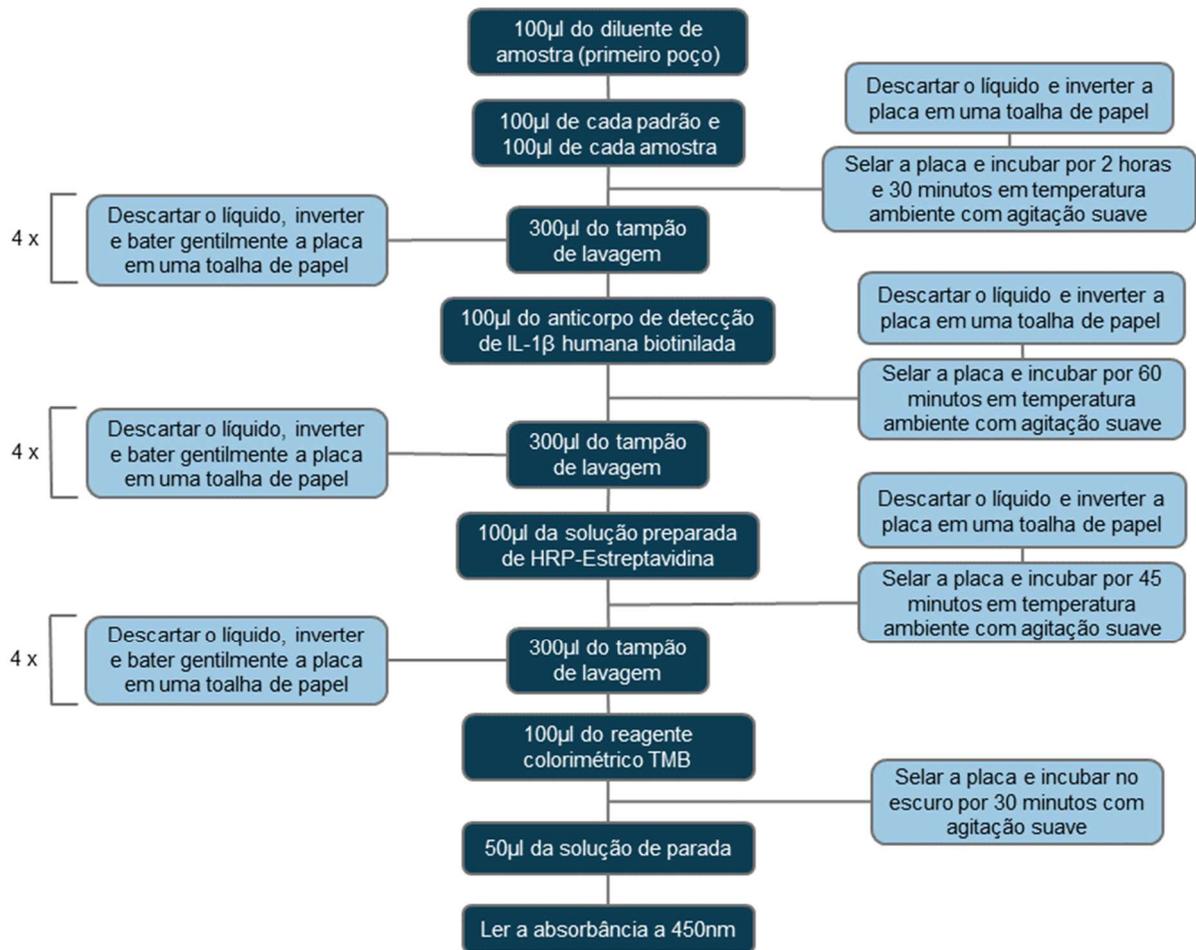
Figura 3 - Fluxograma procedimento de dosagem IL-8.



Fonte: A autora.

A dosagem da IL-1 β também foi realizada a partir das amostras de soro de cada indivíduo selecionado, por meio da técnica de ELISA, utilizado o Human IL-1 beta ELISA Kit (RAB0273, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha). O ensaio foi realizado conforme demonstrado na Figura 4 e, como no teste da IL-8, os reagentes e amostras utilizados foram previamente descongelados, preparados e mantidos em temperatura ambiente durante o procedimento.

Antes da dosagem da IL-1 β , os reagentes necessários foram preparados: O padrão de proteína IL-1 β humana foi reconstituído com 880 μ l do diluente de amostras e agitação suave, seguido de diluição 1:200 antes das demais diluições. O tampão de lavagem foi diluído na proporção 1:20 com água destilada, enquanto o anticorpo de detecção biotinilado e a solução de HRP-Estreptavidina concentrada foram diluídos 80x e 300x, respectivamente, com o diluente fornecido no kit. As amostras de soro foram diluídas com seu respectivo diluente, quando necessário.

Figura 4 - Fluxograma procedimento de dosagem IL-1 β .

Fonte: A autora.

Em ambos os ensaios, IL-8 e IL-1 β , a absorbância de cada amostra foi realizada no leitor de microplacas Synergy H1 (BioTek, USA) no comprimento de onda de 450nm.

Após a leitura da placa, as concentrações das duas interleucinas em cada amostra foram calculadas utilizando-se a fórmula da regressão logarítmica de 4 parâmetros obtida a partir da curva de calibração feita com os padrões de CXCL8 e IL-1 β fornecidos nos Kits. Todos esses cálculos foram realizados utilizando-se a extensão MyCurveFit (MyAssays Ltd.) no programa Excel.

As dosagens da PCR e da LDH foram realizadas nas amostras de soro de cada indivíduo selecionado, por meio das técnicas de imunoturbidimetria e cinética, respectivamente. Ambas as análises foram realizadas no espectrômetro CT300i (Wierner lab Group), utilizando os controles e calibradores da mesma marca. Para a

dosagem da LDH, foram excluídas as amostras que apresentaram hemólise intensa, como recomendado pelo fabricante dos reagentes.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi determinada utilizando o teste de *Shapiro-Wilk*. As variáveis contínuas com distribuição normal foram apresentadas em média e desvio-padrão (média \pm DP), e as comparações entre dois grupos foram realizadas pelo teste *t-student* para amostras independentes ou entre três ou mais condições pela análise de variância para medidas não repetidas (ANOVA), seguida do pós-teste de *Tukey*, quando necessário.

As variáveis contínuas que não apresentaram distribuição normal foram descritas por meio de mediana e intervalo interquartil, e as comparações entre dois grupos foram realizadas pelo teste de *Mann-Whitney* ou entre três ou mais condições pelo teste de *Kruskal-Wallis*.

As variáveis categóricas foram apresentadas em número e percentual, n (%), e as comparações entre os grupos foram realizadas por meio do teste de Qui-Quadrado (χ^2) e ou pelo teste *Exato de Fisher*, quando necessário.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, foi verificado se o tamanho da amostra adquirida foi válido para um estudo caso-controle, assumindo grupos de tamanhos iguais (n=37) para avaliação dos parâmetros laboratoriais. Com base nessas informações, estimou-se um tamanho de efeito de 0,89 e 95% de poder para o teste estatístico para detectar uma proporção estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$).

Os dados foram analisados pelo programa SPSS Statistics 20® (IBM Corp., Armonk, New York, USA). Em todas as análises, o nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO TOTAL DO ESTUDO

A caracterização dos grupos foi realizada a partir dos dados de idade, sexo e fenotipagem de cada indivíduo analisado. Foram coletados dados de toda a população de estudo, 37 (38,95%) indivíduos falciformes e 58 (61,05%) doadores de sangue, somando 95 indivíduos analisados.

No total foram identificados 27 (28,42%) indivíduos com fenótipo Fy(a+b+), 33 (34,74%) indivíduos com fenótipo Fy(a-b+), 30 (31,59%) indivíduos com fenótipo Fy(a+b-), e 5 (5,26%) indivíduos com fenótipo Fy(a-b-). A distribuição dos indivíduos para cada dado analisado está representada na Tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização da população de estudo.

Grupos		Falciformes (n=37)	Doadores (n=58)	p
Sexo, n (%)	F	25 (67,57)	31 (53,45)	0,250
	M	12 (32,43)	27 (46,55)	
Idade, anos		36 ± 14	36 ± 11	0,983
Fenótipo, n (%)	Fy(a+b+)	7 (18,92)	20 (34,48)	0,159
	Fy(a-b+)	14 (37,84)	19 (32,76)	0,775
	Fy(a+b-)	13 (35,13)	17 (29,31)	0,712
	Fy(a-b-)	3 (8,11)	2 (3,45)	0,374

F, feminino; M, masculino.

Fonte: A autora.

A distribuição dos fenótipos em cada um dos grupos sugere o perfil de expressão do antígeno de grupo sanguíneo Duffy em indivíduos falciformes e em indivíduos saudáveis, não sendo observada diferença estatística significativa entre os fenótipos nos grupos analisados.

Os resultados encontrados para a fenotipagem dos doadores foram, no geral, semelhantes aos descritos por Howes e colaboradores (2011) em 10.939 indivíduos das Américas. Os autores descreveram uma frequência de cerca de 35% para cada um dos dois fenótipos Fy(a+b+) e Fy(a+b-), 24% para Fy(a-b+), e pouco mais de 5%

para o fenótipo nulo. A pequena diferença observada deve-se, provavelmente, a população considerada no artigo citado, que abordou dados de fenotipagem das Américas, diferente do presente estudo, que considerou apenas parte da população brasileira.

Ao comparar os resultados da fenotipagem dos doadores com os resultados de outros estudos brasileiros, também é possível observar semelhança. Em 2022, em uma pesquisa realizada com 250 indivíduos saudáveis de Presidente Figueiredo, uma cidade do Amazonas, Langhi Júnior e colaboradores identificaram uma frequência de 38,8% para o fenótipo $Fy(a+b+)$, 27,2% para $Fy(a-b+)$, 31,2% para $Fy(a+b-)$ e 2,8% para $Fy(a-b-)$. Os valores se mostraram bem próximos aos encontrados para os doadores de sangue no presente estudo, apesar da diferença de autodeclaração de cor ou raça em cada região, em que na cidade do Amazonas 72,6% dos indivíduos se autodeclararam pardos, 18,5% brancos e 6,1% pretos, enquanto no Paraná 30,1% dos indivíduos se autodeclararam pardos, 64,6% brancos e 4,2% pretos (IBGE, 2022). A semelhança no perfil genotípico dos indivíduos nos dois estudos pode sugerir uma grande miscigenação na população brasileira, onde a cor ou raça dos indivíduos pode não ser mais um indicativo do padrão de expressão de antígenos de grupo sanguíneo originalmente relacionados com a ancestralidade.

Ainda, em 2017, Martins e colaboradores descreveram uma frequência de 26,02% para $Fy(a+b+)$, 39,69% para $Fy(a-b+)$, 23,24% para $Fy(a+b-)$ e 11,06% para $Fy(a-b-)$, em seu estudo com 33.195 doadores de sangue de Minas Gerais. A diferença mais expressiva encontrada foi em relação ao fenótipo nulo, em que o estudo mineiro apresentou quase 4 vezes mais indivíduos com esse fenótipo, quando comparado ao presente trabalho. Essa diferença pode ser atribuída a quantidade de indivíduos de origem negroide encontrada nessa região, como é demonstrado pelo Censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2022, em que 11,8% dos residentes no estado de Minas Gerais se autodeclararam pretos, número quase 3 vezes maior do que no Paraná, em que apenas 4,2% dos residentes se autodeclararam pretos.

Além disso, observando os resultados da fenotipagem, foi possível calcular a frequência dos antígenos Fy^a e Fy^b nos dois grupos analisados. As frequências antigênicas observadas estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Frequência antigênica de Fy^a e Fy^b nos grupos estudados.

Antígeno	Falciformes (n=37)	Doadores (n=58)
Fy ^a	20 (54,05)	37 (63,79)
Fy ^b	21 (56,76)	39 (67,24)

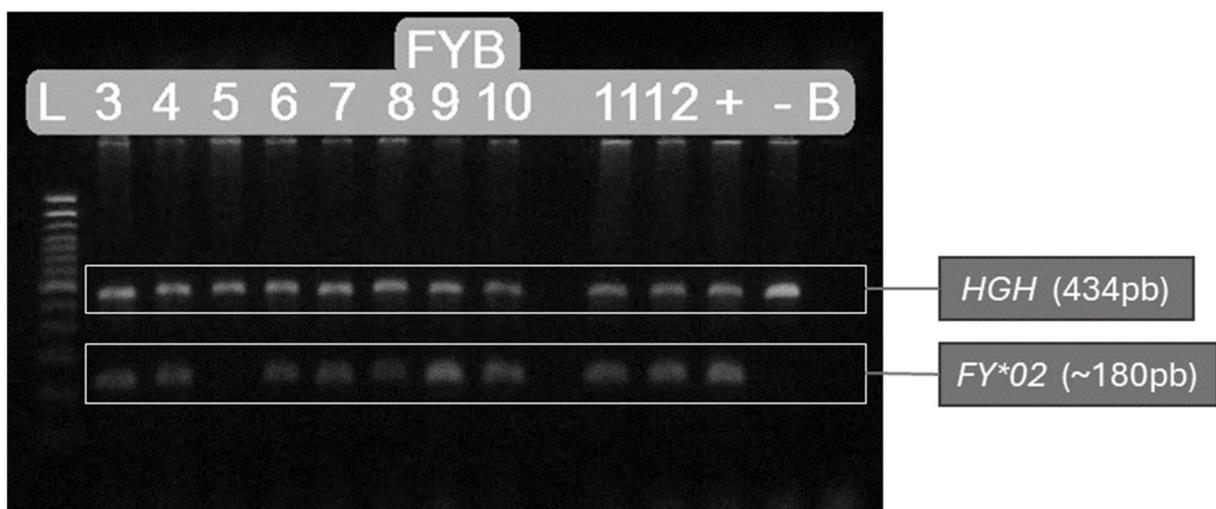
Fonte: A autora.

As frequências antigênicas obtidas identificam o perfil do antígeno Duffy na população estudada, porém não são semelhantes às frequências nacionais. Isso pode ser verificado comparando-se os resultados do presente estudo, com o apresentado por Maheshwari e Killeen (2023), que identificaram uma frequência de 39% para Fy^a e 50% para Fy^b, no Brasil. Essa diferença pode ter ocorrido devido à grande miscigenação e diversidade racial presente no país, características que podem levar a frequências diferentes em cada região do país e na média nacional.

5.2 GENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO TOTAL DO ESTUDO

A leitura dos resultados da genotipagem foi realizada através da imagem, registrada em fotodocumentador, de cada gel revelado após a eletroforese. Uma das imagens obtidas com a identificação dos fragmentos está representada na Figura 5.

Figura 5 - Eletroforese de fragmentos amplificados para identificação do alelo *FY*02*.



L, Marcador de tamanho molecular (Ladder); pb, pares de bases nitrogenadas; +, controle positivo; -, controle negativo; B, branco.

Fonte: A autora.

Os resultados da genotipagem dos alelos *FY*01*, *FY*02* e *FY*02N.01* para os 37 indivíduos falciformes e 58 doadores de sangue estão demonstrados na Tabela 4. No total foram identificados 32 (33,68%) indivíduos com o genótipo *FY*01/FY*02*, 10 (10,53%) indivíduos com o genótipo *FY*01/FY*01*, 24 (25,26%) indivíduos com o genótipo *FY*02/FY*02* e 4 (4,21%) indivíduos com o genótipo *FY*02N.01/FY*02N.01*. Além disso, foram identificados 14 (14,74%) indivíduos com o genótipo *FY*01/FY*02N.01*, e 11 (11,58%) indivíduos com o genótipo *FY*02/FY*02N.01*.

Tabela 4 - Genótipo da população total de pacientes falciformes e doadores.

Genótipo	Falciformes (n=37)	Doadores (n=58)	p
<i>FY*01/FY*02</i>	9 (24,32)	23 (39,65)	0,187
<i>FY*01/FY*01</i>	3 (8,11)	7 (12,07)	0,735
<i>FY*02/FY*02</i>	9 (24,32)	15 (25,86)	0,941
<i>FY*01/FY*02N.01</i>	7 (18,92)	7 (12,07)	0,534
<i>FY*02/FY*02N.01</i>	7 (18,92)	4 (6,90)	0,102
<i>FY*02N.01/FY*02N.01</i>	2 (5,41)	2 (3,45)	1,000

Fonte: A autora.

A partir dos resultados representados na Tabela 4, foi possível traçar o perfil genotípico relacionado ao grupo sanguíneo Duffy nos indivíduos falciformes e nos doadores analisados, demonstrando a frequência de cada genótipo em cada grupo.

Assim, identificou-se que o perfil genotípico encontrado para os doadores de sangue foi diferente do perfil encontrado na literatura. O estudo de Zacarias e colaboradores (2016), conduzido com 251 doadores de sangue de Francisco Beltrão, na região sudoeste do Paraná, apresentou as frequências de 46,22% para o genótipo *FY*01/FY*02*, 19,52% para o genótipo *FY*01/FY*01*, 29,88% para o genótipo *FY*02/FY*02*, 1,99% para cada um dos dois genótipos com mutação em heterozigose, e 0,4% para o genótipo mutado em homozigose. Assim, o presente estudo demonstrou uma frequência seis vezes maior para o genótipo *FY*01/FY*02N.01*, três vezes maior para o genótipo *FY*02/FY*02N.01* e oito vezes maior para o fenótipo *FY*02N.01/FY*02N.01*, quando comparado ao estudo citado da literatura, identificando um perfil diferente na região contemplada nesse trabalho.

Em contrapartida, o estudo de Guelsin e colaboradores (2010), conduzido com 400 doadores de sangue de Maringá, região noroeste do Paraná, demonstrou uma frequência de 78% de genótipos sem a mutação, 19,5% de genótipos com a mutação em heterozigose e 2,5% de genótipos com a mutação em homozigose, resultados muito semelhantes aos do presente trabalho, onde foi encontrada uma frequência de 77,58% de genótipos sem a mutação, 18,97% de genótipos com a mutação em heterozigose e 3,45% de genótipos em homozigose.

Além dos genótipos, a frequência alélica em cada grupo também foi calculada e analisada a partir dos resultados obtidos na genotipagem. As frequências de cada alelo pesquisado estão demonstradas na Tabela 5.

Tabela 5 - Frequência dos alelos *FY*01*, *FY*02* e *FY*02N.01* na população total analisada.

Grupo	Falciformes			Doadores			
	Alelo	<i>FY*01</i>	<i>FY*02</i>	<i>FY*02N.01</i>	<i>FY*01</i>	<i>FY*02</i>	<i>FY*02N.01</i>
n		22	34	18	44	57	15
Frequência		29,73	45,95	24,32	37,93	49,14	12,93

n = número de alelos.

Fonte: A autora.

Analisando-se as frequências alélicas, foi possível identificar nesse trabalho, um perfil diferente do encontrado para o país. O estudo de Ortega e colaboradores (2023), demonstrou uma frequência alélica de 41% para o alelo *FY*01*, 39% para o alelo *FY*02*, e 21% para o alelo mutado (*FY*02N.01*), na população brasileira. Essa diferença encontrada pode estar relacionada, novamente, a diferença na distribuição racial e étnica no país, sendo o perfil nacional não representativo de cada região isolada.

Além disso, foi possível verificar a frequência do alelo mutado em cada grupo, em que foram identificados 18 (24,32%) alelos mutados no grupo dos falciformes, enquanto no grupo dos doadores foram identificados 15 (12,93%) alelos mutados. Dessa maneira, a frequência da mutação em indivíduos falciformes foi de aproximadamente o dobro da frequência observada em indivíduos sem a doença, concordando com o descrito por Ortega e colaboradores (2023), que demonstraram correlação positiva entre a presença da HbS e o alelo mutado (*FY*02N.01*).

5.3 DIVERGÊNCIA ENTRE A FENOTIPAGEM E A GENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO TOTAL DE ESTUDO

Com a análise dos dados de fenotipagem e genotipagem, foram observadas algumas divergências entre os resultados das duas técnicas. No total foram identificados 9 (9,47%) casos de divergência, sendo 4 (10,81%) casos no grupo dos falciformes e 5 (8,62%) casos no grupo dos doadores. O fenótipo deduzido da genotipagem foi utilizado para uma melhor visualização das diferenças observadas, que estão representadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Casos de divergência entre fenotipagem e genotipagem na população total analisada.

Grupo	Caso	Genótipo	Fenótipo deduzido	Fenótipo
Falciformes	1	<i>FY*02/FY*02</i>	Fy(a-b+)	Fy(a+b-)
	2	<i>FY*02/FY*02</i>	Fy(a-b+)	Fy(a-b-)
	3	<i>FY*01/FY*02</i>	Fy(a+b+)	Fy(a+b-)
	4	<i>FY*01/FY*02</i>	Fy(a+b+)	Fy(a+b-)
Doadores	1	<i>FY*01/FY*01</i>	Fy(a+b-)	Fy(a+b+)
	2	<i>FY*01/FY*02</i>	Fy(a+b+)	Fy(a+b-)
	3	<i>FY*01/FY*02</i>	Fy(a+b+)	Fy(a+b-)
	4	<i>FY*01/FY*02</i>	Fy(a+b+)	Fy(a+b-)
	5	<i>FY*01/FY*02</i>	Fy(a+b+)	Fy(a+b-)

Fonte: A autora.

Entre os casos de divergência observados no grupo dos falciformes, o caso 1 é considerado o mais importante devido a fenotipagem indicar um fenótipo contrário ao obtido na genotipagem, apresentando risco ao indivíduo no caso de necessidade de transfusão. Essa divergência provavelmente ocorreu devido a um erro na realização da técnica ou leitura da fenotipagem. Nos casos 2, 3 e 4 foi observada a ausência do antígeno Fy^b na fenotipagem, o qual foi positivo na genotipagem, sem a presença da mutação em GATA-1.

No grupo dos doadores, o resultado divergente do caso 1 também provavelmente ocorreu devido a falha técnica na execução da fenotipagem, uma vez que foi identificado o antígeno Fy^b e na genotipagem foi verificado que o indivíduo não

apresenta o alelo responsável pela expressão desse antígeno. Nos demais casos desse grupo, assim como nos últimos casos dos falciformes, o antígeno Fyb não foi identificado na fenotipagem, ainda que os indivíduos apresentem o alelo responsável pela expressão desse antígeno, sem a presença da mutação em GATA-1.

As discrepâncias observadas nos casos 2, 3 e 4 no grupo dos falciformes, e nos casos 2, 3, 4 e 5 dos doadores, podem ter ocorrido devido a fraca expressão do antígeno na superfície das hemácias, ou devido ao uso do antissoro anti-Fy^b policlonal na fenotipagem, que apresenta baixa reatividade e poderia resultar em um resultado falso negativo. Também, pode ter ocorrido falha na execução da técnica de fenotipagem ou leitura incorreta do resultado.

5.4 SELEÇÃO DOS GRUPOS PARA A DOSAGEM DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E HEMÓLISE

Para a realização das análises laboratoriais, foram incluídos os 37 indivíduos falciformes, e selecionados 37 doadores do grupo controle de acordo com a idade, sexo e fenótipo deduzido. Ainda, foi considerado o uso de hidroxureia pelos indivíduos falciformes uma vez que esse uso poderia interferir na dosagem da LDH e IL-1 β (Chenou et al., 2021; Gomes et al., 2023). Esses parâmetros dos grupos selecionados estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 - Caracterização dos grupos para as análises laboratoriais.

Grupos		Falciformes	Doadores	p
Sexo, n (%)	F	25 (67,57)	24 (64,86)	0,812
	M	12 (32,43)	13 (35,14)	
Idade, anos		36 \pm 14	36 \pm 12	0,839
Hidroxureia, S / N		33 / 4	–	–
Fenótipo deduzido, n (%)	Fy(a+b+)	9 (24,32)	9 (24,32)	1,000
	Fy(a-b+)	16 (43,24)	16 (43,24)	1,000
	Fy(a+b-)	10 (27,03)	10 (27,03)	1,000
	Fy(a-b-)	2 (5,41)	2 (5,41)	1,000

F, feminino. M, masculino. S, sim. N, não. – , não se aplica.

Fonte: A autora.

Foram obtidos dados quanto ao uso de hidroxiureia dos pacientes falciformes, em que 33 (89,19%) faziam uso do medicamento e 4 (10,81%) não utilizavam o medicamento até o momento da coleta dos dados e das amostras.

O fenótipo deduzido foi escolhido como critério de seleção dos 37 doadores a fim de comparar os indivíduos de acordo com a genotipagem e evitando possíveis erros que poderiam resultar da divergência entre a feno e a genotipagem. A partir desse item, todas as análises laboratoriais e estatísticas apresentadas, foram realizadas utilizando as amostras dos 74 indivíduos acima representados.

5.5 DOSAGEM DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E HEMÓLISE

Os marcadores de inflamação e hemólise foram dosados, e suas concentrações foram calculadas para cada uma das 74 amostras selecionadas para as análises laboratoriais. Os resultados obtidos para cada um dos quatro marcadores analisados, e a análise estatística desses resultados entre os grupos, estão descritos abaixo (Tabela 8).

Tabela 8 - Dosagem dos marcadores de inflamação e hemólise nos indivíduos falciformes e doadores analisados.

Marcadores	Falciformes (n=37)	Doadores (n=37)	p
IL-8 (pg/mL)	13,3 (9,3 - 23,1)	5,1 (3,3 - 8,9)	< 0,001*
IL-1 β (pg/mL)	0,53 (0,01 - 6,16)	0,26 (0,00 - 3,21)	0,384
PCR (mg/L)	3,7 (2,3 - 8,0)	2,0 (0,5 - 2,6)	< 0,001*
LDH (U/L)	777 (578 - 1152)	349 (314 - 375)	< 0,001*

Mediana e intervalo interquartil. IL-8, interleucina 8. IL-1 β , interleucina 1 β . PCR, proteína C reativa. LDH, lactato desidrogenase. *diferença estatística entre os grupos, p<0.05.

Fonte: A autora.

Analisando os resultados apresentados na Tabela 8, foi possível identificar diferença estatística significativa entre os dois grupos analisados para os marcadores IL-8, PCR e LDH, em que o grupo dos indivíduos falciformes apresentou as maiores concentrações séricas desses marcadores. Não foi verificada diferença estatística significativa entre os grupos na dosagem da IL-1 β , porém os níveis elevados dos

demais marcadores indicam a presença de inflamação e hemólise nesses indivíduos, mesmo com clínica estável.

A diferença identificada entre os indivíduos falciformes e os controles saudáveis na dosagem da IL-8, condiz com o encontrado por Li e colaboradores (2023), que também verificaram níveis mais altos dessa interleucina em um grupo de 40 pacientes falciformes com faixa etária semelhante à dos indivíduos do presente estudo. Esse resultado em concordância reforça a existência de um estado inflamatório desregulado nesses indivíduos.

Os níveis de PCR identificados nos falciformes estão em concordância ao encontrado por Li e colaboradores (2024) em um grupo de 40 indivíduos que apresentavam alguma hemoglobinopatia associada à HbS, com distribuição de idade e sexo semelhantes à do presente estudo. Os autores identificaram maiores níveis de PCR nesses indivíduos comparados a indivíduos saudáveis sem hemoglobinopatias, com uma mediana de 3,6 (1,6 - 7,3). Essa semelhança nos resultados demonstra a instauração de um processo inflamatório nos indivíduos analisados, caracterizando uma inflamação crônica, mesmo quando estáveis clinicamente.

Comparando-se os níveis de LDH obtidos para cada grupo, foi identificada diferença estatística significativa, com os indivíduos falciformes apresentando valores aproximadamente duas vezes maiores quando comparados aos doadores de sangue, demonstrando um perfil hemolítico crônico nos indivíduos que apresentam a doença falciforme, mesmo quando estáveis, e indicando o risco de uma crise vaso oclusiva (Feugray et al., 2023).

Na pesquisa de Mecabo e colaboradores (2015), os autores identificaram, em um grupo de 20 indivíduos HbSS estáveis com média de idade semelhante à do presente estudo, concentrações de LDH com mediana e intervalo interquartil de 526 (384 - 691) U/L. No mesmo estudo os valores encontrados para os controles saudáveis foi de 152 (136 - 172) U/L, sendo ambos os valores no geral mais baixos do que os encontrados no presente trabalho. Analisando o descrito por Mecabo e colaboradores, e comparando com os resultados obtidos, pode-se considerar as concentrações obtidas como um reflexo do perfil de LDH na população analisada, uma vez que os valores são maiores, porém proporcionais aos da literatura.

Os níveis encontrados para LDH mais altos do que o descrito pelos autores da referência utilizada, não apenas nas amostras dos indivíduos falciformes, mas

também para os controles saudáveis, demonstram a reprodutibilidade do teste entre as amostras de estudo e controle, sem a sugestão de crise hemolítica, e podem ter ocorrido devido a uma metodologia de determinação de LDH diferente em cada estudo. Ainda, pode ter ocorrido hemólise *in vitro* entre o período de coleta das amostras e realização dos testes, o que levaria ao aumento dos níveis séricos do marcador em todas as amostras, como foi observado.

Em grande parte da literatura, os níveis séricos de IL-1 β em indivíduos HbSS são descritos como maiores e estatisticamente diferentes dos níveis séricos em indivíduos HbAA (Garcia et al., 2020; Gomes et al., 2023), principalmente associados ao papel dessa interleucina na inflamação. Porém alguns autores não verificaram diferença significativa entre indivíduos falciformes e controles saudáveis (Keikhaei et al., 2013), como o encontrado no presente estudo, em que não foi identificada diferença estatística ($p=0,384$) entre os grupos analisados. Esse resultado poderia ter ocorrido devido ao uso de hidroxiureia (HU) por grande parte dos indivíduos falciformes analisados, como foi demonstrado na Tabela 7, em que 33 indivíduos faziam uso do medicamento.

Para uma melhor análise dos níveis dos marcadores em comparação com o uso de hidroxiureia, foi realizada análise estatística dos níveis de cada marcador entre os indivíduos falciformes que faziam e os que não faziam uso desse medicamento. Os resultados dessa análise estão representados na Tabela 9.

Tabela 9 - Marcadores de inflamação e hemólise nos indivíduos falciformes considerando o uso de hidroxiureia.

Marcadores	Falciformes		p
	Com HU (n=33)	Sem HU (n=4)	
IL-8 (pg/mL) Mediana (IQ)	13,09 (8,23 – 23,09)	17,29 (13,75 – 49,62)	0,203
IL-1 β (pg/mL) Mediana (IQ)	1,26 (0,01 – 6,79)	0,21 (0,04 – 0,44)	0,407
PCR (mg/L) Mediana (IQ)	3,6 (2,2 – 6,0)	12,4 (12,0 – 21,25)	0,006*
LDH (U/L) Mediana (IQ)	689 (546 – 988)	1552 (948 – 2038)	0,023*

Mediana e intervalo interquartil. HU, hidroxiureia. IL-8, interleucina 8. IL-1 β , interleucina 1 β . PCR, proteína C reativa. LDH, lactato desidrogenase. *diferença estatística entre os grupos, $p<0,05$.

Fonte: A autora.

Observando os níveis dos marcadores entre os indivíduos falciformes com e sem uso de hidroxiureia, é possível identificar que não houve diferença significativa nos níveis de IL-8 e IL-1 β entre esses indivíduos, enquanto os níveis de PCR e LDH se apresentaram estatisticamente diferentes.

De acordo com o encontrado no presente estudo, Zahran e colaboradores (2020) também não identificaram diferença significativa nos níveis de IL-8 em 35 crianças com doença falciforme que não utilizavam a hidroxiureia no tratamento, e depois de 1 ano realizando o tratamento com esse medicamento. Da mesma maneira, Keikhaei e colaboradores (2013) não verificaram diferença estatística nos níveis de IL-8 em 54 adultos com doença falciforme com e sem terapia utilizando HU.

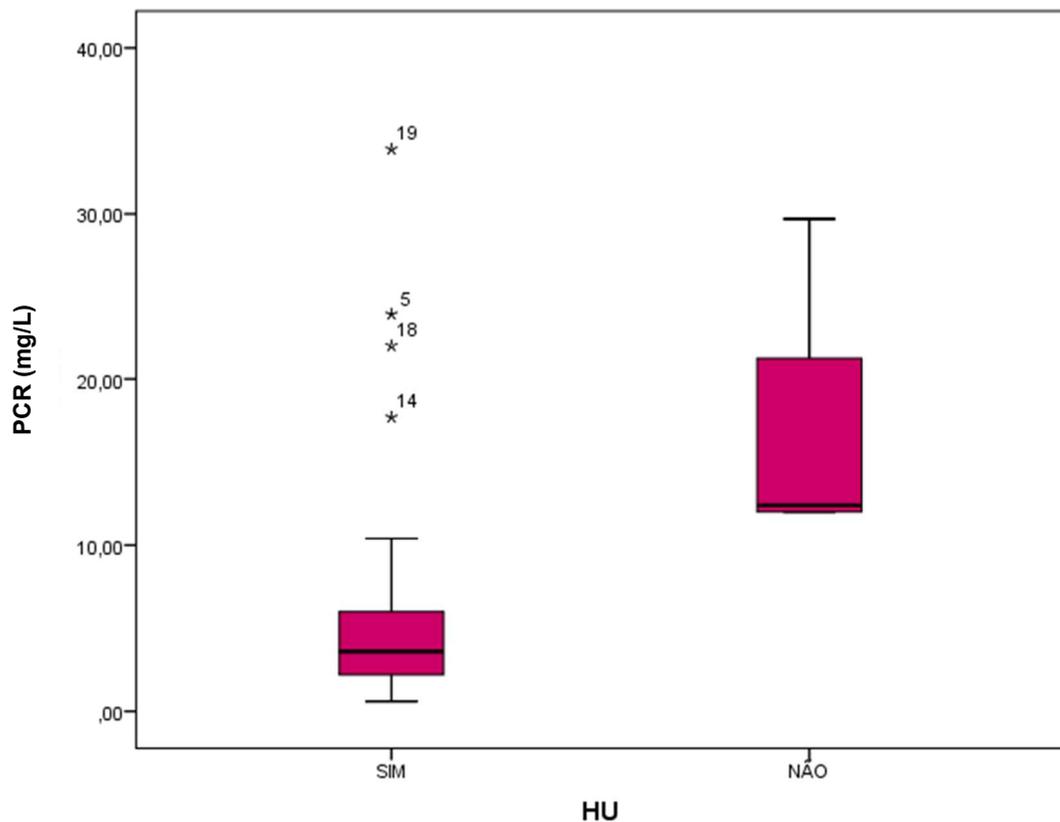
Com relação à IL-1 β , a identificação de homogeneidade nos níveis dessa interleucina ($p=0,718$) entre os indivíduos falciformes com e sem o uso de HU, sugere que a produção e/ou liberação da interleucina não sofreu influência do medicamento. Esse resultado se assemelha ao descrito por Keikhaei e colaboradores (2013), que também não verificaram diferença significativa nos níveis de IL-1 β em indivíduos que apresentavam doença falciforme utilizando ou não a hidroxiureia. Em contrapartida, os estudos de Guarda e colaboradores (2019), com crianças falciformes, e de Freitas Dutra e colaboradores (2022), com adultos falciformes, identificaram níveis reduzidos de IL-1 β induzida por lipopolissacarídeos (LPS), nos indivíduos que utilizavam hidroxiureia no tratamento.

Assim, pode-se sugerir influência do mecanismo que leva ao aumento de IL-1 β , uma vez que Erdei e colaboradores (2018) identificaram que apenas a liberação do heme após hemólise não é capaz de ativar com intensidade o inflamassoma e levar produção de TNF- α e IL-1 β em grande quantidade, sendo o LPS, molécula presente em bactérias gram-negativas, responsável pela forte ativação e liberação dessas citocinas. Dessa maneira, a ausência de quadro infeccioso pode ser um dos fatores influenciando nos níveis de IL-1 β obtidos, além da possível limitação do presente trabalho, em relação ao tamanho amostral e ao número de indivíduos que não fazem uso da hidroxiureia em seu tratamento.

Em relação à PCR, foi verificada diferença estatística ($p=0,006$) entre os indivíduos HbSS que usavam e os que não usavam hidroxiureia, como é possível visualizar na Figura 6, sendo os maiores níveis desse marcador identificados nos indivíduos que não faziam uso do medicamento. Esse resultado é diferente do

encontrado na literatura, onde tanto Teixeira e colaboradores (2017), quanto Zahran e colaboradores (2020), que realizaram análises em crianças com anemia falciforme com e sem uso do medicamento, não verificaram diferença entre os grupos na dosagem desse marcador. Não foram encontrados estudos comparando os níveis de PCR em indivíduos HbSS adultos com e sem uso de hidroxiureia.

Figura 6 - Níveis de PCR encontrados nos indivíduos falciformes com e sem uso de hidroxiureia.

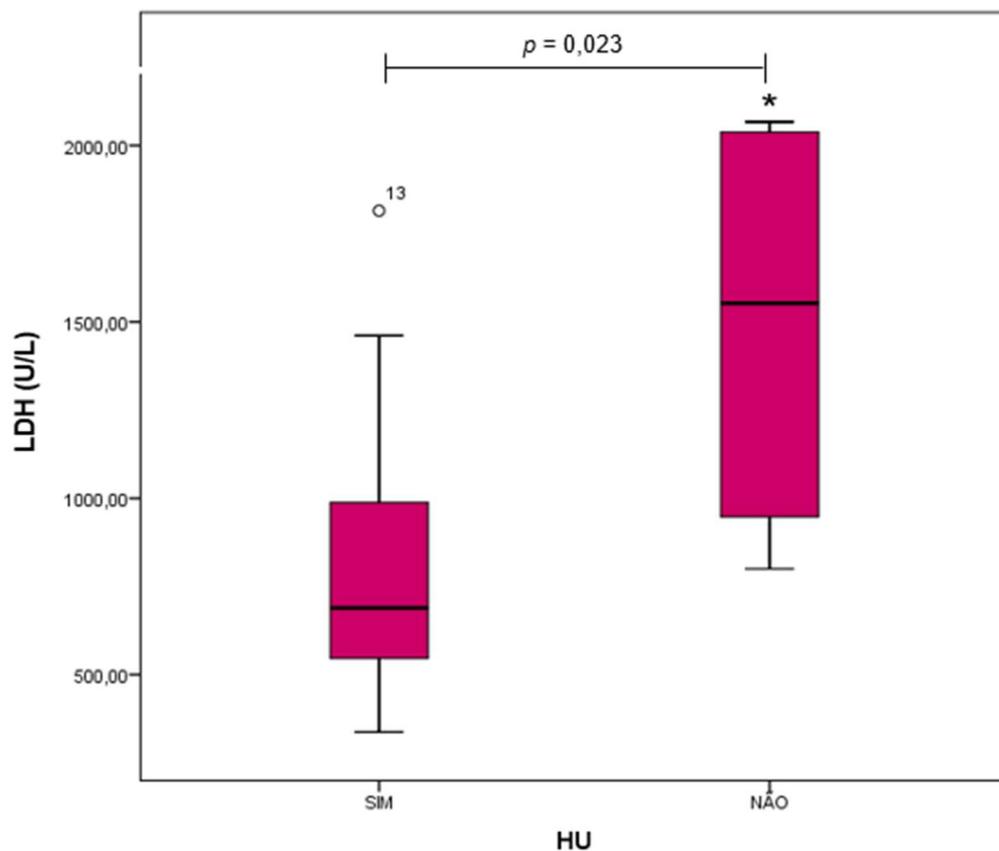


PCR, proteína C reativa; HU, hidroxiuréia.
Fonte: A autora

Os níveis de LDH encontrados apresentaram diferença estatística significativa entre os indivíduos falciformes com e sem uso de hidroxiureia, resultado que pode ser melhor visualizado na Figura 7, e está de acordo com o descrito por Chenou e colaboradores (2021). Os autores identificaram os maiores níveis desse marcador nos indivíduos que não faziam o uso do medicamento, como observado no presente estudo, onde os indivíduos que não utilizavam hidroxiureia até o momento da coleta das amostras, demonstraram os maiores níveis de LDH. Ainda, Mecabo e colaboradores (2015) não identificaram diferença estatística significativa nos níveis de LDH entre indivíduos falciformes com e sem o uso de HU. A partir desses dados,

observa-se que ainda não há um consenso na literatura sobre os efeitos da hidroxiureia nos níveis de LDH, e os resultados obtidos contribuem para a discussão da influência do medicamento na hemólise e liberação desse marcador. Ainda, a possível ocorrência de hemólise *in vitro* e o tamanho amostral podem ter interferido nos níveis de LDH observados.

Figura 7 - Níveis de LDH em indivíduos falciformes com e sem o uso de hidroxiureia.



LDH, lactato desidrogenase; HU, hidroxiureia.
Fonte: A autora.

Assim, o encontrado no presente trabalho em relação aos dois últimos marcadores sugere que o uso da hidroxiureia pode estar reduzindo os níveis de PCR e LDH em indivíduos falciformes adultos. Isso poderia ser atribuído à ação do medicamento que age aumentando a quantidade de HbF e, conseqüentemente, reduzindo a quantidade de HbS presente nas hemácias, o que pode reduzir a polimerização da desoxi-HbS (Charache et al., 1992; Sales et al., 2022; Thakur et al., 2019). A menor polimerização da HbS reduz conseqüentemente a hemólise, o que poderia levar à redução dos níveis de PCR e LDH nos indivíduos, como foi observado.

Apesar dessa diferença, os níveis de ambos os marcadores permaneceram significativamente maiores em comparação com os marcadores nos doadores saudáveis, quando incluídos apenas os indivíduos que utilizavam o medicamento no teste estatístico. Dessa maneira, optou-se por manter todos os indivíduos falciformes nas análises, sem exclusão dos indivíduos que faziam ou não faziam uso da hidroxiureia como parte do tratamento.

Após a comparação dos níveis dos quatro marcadores analisados entre os indivíduos falciformes e os doadores saudáveis, foi realizada a análise da IL-8, IL-1 β , PCR e LDH em cada um dos seis genótipos, para cada grupo. Os resultados obtidos para cada genótipo e sua análise estatística estão representados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Marcadores de inflamação e hemólise nos doadores de sangue de acordo com o genótipo.

Genótipo	Doadores				
	n	IL-8 (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	PCR (mg/L)	LDH (U/L)
		Mediana (IQ)	Mediana (IQ)	Mediana (IQ)	Mediana (IQ)
<i>FY*01/FY*02</i>	9	6,2 (4,4 - 16,4)	0,0 (0,0 - 0,2)	0,8 (0,2 - 2,6)	330 (306 - 372)
<i>FY*01/FY*01</i>	4	7,9 (5,0 - 26,5)	3,0 (1,3 - 41,1)	1,7 (0,6 - 2,9)	374 (296 - 388)
<i>FY*02/FY*02</i>	13	4,1 (2,5 - 5,6)	0,3 (0,04 - 1,6)	2,0 (0,4 - 3,0)	314 (295 - 375)
<i>FY*01/FY*02N.01</i>	6	4,1 (3,1 - 9,1)	1,7 (0,1 - 61,7)	2,6 (1,9 - 4,1)	353 (343 - 399)
<i>FY*02/FY*02N.01</i>	3	6,7 (5,6 - 8,6)	6,9 (3,4 - 7,1)	1,4 (1,2 - 1,7)	369 (364 - 388)
<i>FY*02N.01/FY*02N.01</i>	2	2,8 (2,6 - 3,1)	0,01 (0,0 - 0,02)	1,3 (0,4 - 2,2)	376 (361 - 391)
p		0,137	0,095	0,484	0,328

Mediana e intervalo interquartil. IL-8, interleucina 8. IL-1 β , interleucina 1 β . PCR, proteína C reativa. LDH, lactato desidrogenase.

Fonte: A autora.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 10, foi possível verificar que, para os quatro marcadores pesquisados, não houve diferença estatística significativa entre os genótipos dos doadores, demonstrando que a presença da mutação em GATA-1 não interfere nos níveis dos marcadores inflamatórios em indivíduos saudáveis.

Tabela 11 - Marcadores de inflamação e hemólise nos indivíduos falciformes de acordo com o genótipo.

Genótipo	Falciformes				
	n	IL-8 (pg/mL) Média ± DP	IL-1β (pg/mL) Mediana (IQ)	PCR (mg/L) Mediana (IQ)	LDH (U/L) Média ± DP
<i>FY*01/FY*02</i>	9	18,2 ± 9,6*	0,2 (0,0 – 3,8)	3,7 (3,4 - 1,2)	963 ± 412
<i>FY*01/FY*01</i>	3	10,5 ± 3,7*	32,9 (16,5 – 142,3)	6,0 (5,3 - 7,0)	550 ± 114
<i>FY*02/FY*02</i>	9	11,8 ± 5,3*	2,9 (0,5 – 101,5)	2,6 (2,2 - 6,2)	960 ± 525
<i>FY*01/FY*02N.01</i>	7	20,6 ± 5,2*	0,2 (0,1 – 1,6)	4,1 (3,8 - 5,5)	836 ± 366
<i>FY*02/FY*02N.01</i>	7	11,8 ± 2,7*	0,001 (0,0 – 4,6)	2,8 (1,9 - 4,6)	670 ± 284
<i>FY*02N.01/FY*02N.01</i>	2	51,2 ± 39,5	0,4 (0,1 – 0,7)	7,5 (2,1 - 12,8)	1545 ± 739
p		0,003	0,602	0,724	0,124

Média ± desvio-padrão; mediana e intervalo interquartil. IL-8, interleucina 8. IL-1β, interleucina 1β. PCR, proteína C reativa. LDH, lactato desidrogenase. *diferença estatística do grupo *FY*02N.01/FY*02N.01*, p<0,05.

Fonte: A autora.

Analisando os dados apresentados na Tabela 11, foi possível identificar que não houve diferença significativa entre os genótipos para os marcadores IL-1β, PCR e LDH no grupo falciforme, sugerindo que a presença da mutação não tem interferência nos níveis séricos dessas moléculas nesses indivíduos, quando estáveis.

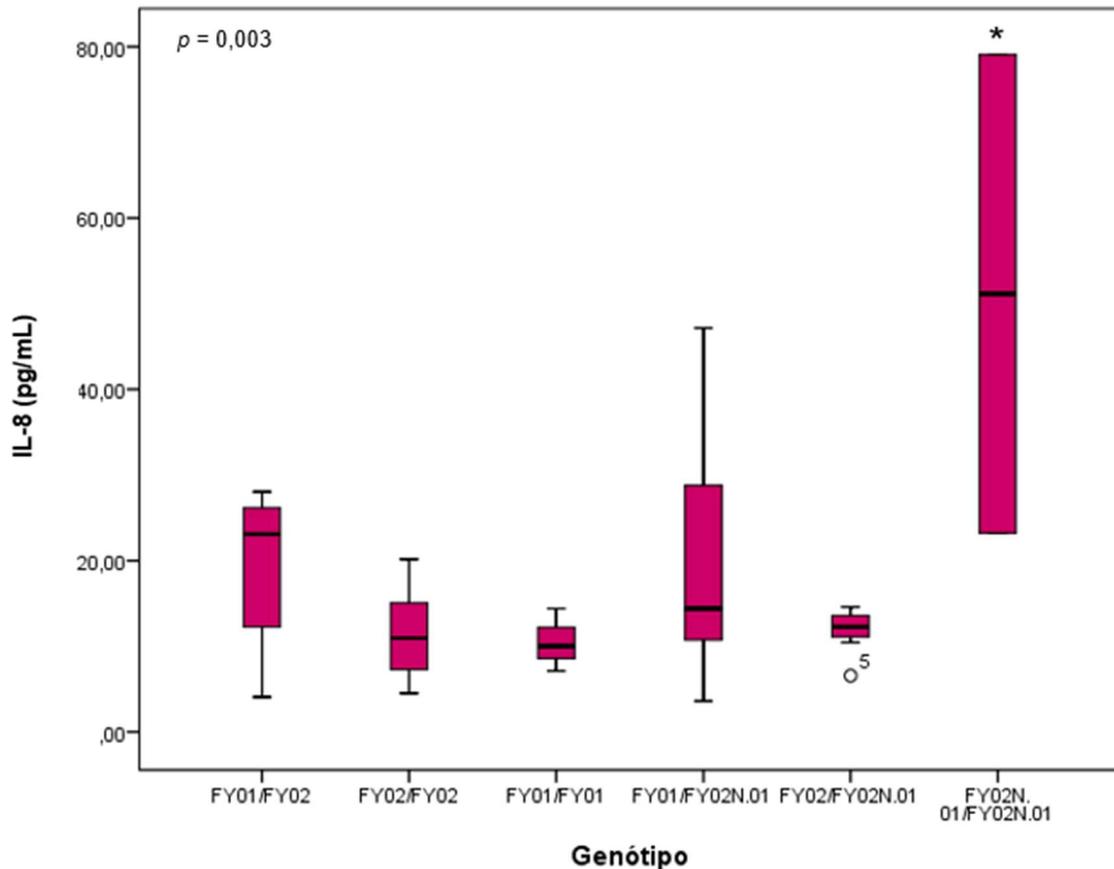
Diferente de Mecabo e colaboradores (2010), que em sua pesquisa com 87 pacientes falciformes, identificaram diferença estatística entre os níveis de LDH nos indivíduos com fenótipo Duffy positivo e Duffy negativo, Drasar e colaboradores (2013) em sua pesquisa no Reino Unido com 272 indivíduos falciformes de faixa etária e sexo semelhantes aos do presente estudo, não verificaram diferença estatística significativa entre os genótipos com e sem a mutação em GATA-1. Também, Nebor e colaboradores (2010), não identificaram diferença significativa nos níveis de PCR e LDH entre 212 indivíduos falciformes estáveis com fenótipo Duffy positivo e Duffy negativo, resultados que estão de acordo com o encontrado no presente estudo, em que não verificou-se diferença significativa nos níveis desses marcadores entre os genótipos analisados.

Os resultados obtidos, em conjunto com a literatura, reforçam a existência de níveis aumentados de PCR e LDH nos indivíduos falciformes, devido ao processo inflamatório crônico desencadeado pela doença, porém a presença da mutação e expressão do antígeno Duffy parecem não interferir na liberação e manutenção desses marcadores na circulação.

Ainda, não é consolidada a influência do antígeno Duffy nos níveis de IL-8 circulantes. Ao contrário de Nebor e colaboradores (2010), que encontraram maiores níveis de IL-8 em indivíduos falciformes Duffy positivo comparado a indivíduos Duffy negativo, Schnog e colaboradores (2000) descreveram maiores níveis de IL-8 em indivíduos falciformes Duffy negativo. Além disso, não foram encontrados estudos que avaliassem os níveis séricos de IL-8 em indivíduos falciformes de acordo com os genótipos do sistema de grupo sanguíneo Duffy.

No presente trabalho, analisando os resultados de IL-8 na Tabela 11, foi possível identificar diferença estatística nos níveis dessa interleucina entre os genótipos ($p=0,003$). Esse resultado pode ser identificado visualmente na Figura 8, e a diferença observada pode ser atribuída à presença da mutação em GATA-1 em homozigose, que foi diferente estatisticamente de todos os outros genótipos. A mutação em heterozigose, porém, não apresentou influência nos valores de IL-8 sérico, assim como os demais genótipos.

Figura 8 - Níveis de IL-8 séricos nos indivíduos falciformes de acordo com o genótipo.



IL-8, interleucina 8.
Fonte: A autora.

Esse resultado demonstra que o antígeno Duffy pode ter influência nos níveis séricos de IL-8 nos indivíduos falciformes, uma vez que a ausência desse antígeno, isto é, a presença do alelo mutado em homozigose, aliada ao estado inflamatório crônico, pode estar aumentando os níveis dessa interleucina, mesmo com os indivíduos sem crise inflamatória no período de coleta das amostras.

Como demonstrado por Bester e colaboradores (2018), a IL-8 apresenta efeito importante na formação de pequenos trombos capazes de levar à oclusão de pequenos vasos, fator de alerta na doença falciforme devido a predisposição à ocorrência de vaso oclusão nesses indivíduos. Dessa maneira, os resultados indicam a necessidade de uma atenção especial aos indivíduos falciformes com fenótipo Duffy nulo desde o diagnóstico da doença, pois além da predisposição às crises vaso oclusivas, os níveis de IL-8 elevados somados à fisiopatologia da doença falciforme aumentam o risco de vaso-oclusão nesses indivíduos.

4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos na genotipagem foi possível identificar a presença da mutação em GATA-1 em homozigose nos indivíduos que apresentaram fenótipo Fy(a-b-), e em heterozigose em alguns indivíduos que apresentaram os fenótipos Fy(a+b-) e Fy(a-b+). Assim, foi traçado o perfil genotípico e de frequência alélica nos indivíduos falciformes.

Com a dosagem dos marcadores de inflamação e hemólise (IL-8, IL-1 β , LDH e PCR), verificou-se maiores níveis dos marcadores IL-8, PCR e LDH nos indivíduos falciformes HbSS quando comparados aos doadores saudáveis com e sem a mutação em GATA-1, enquanto a IL-1 β não apresentou diferença significativa entre os grupos.

O uso da hidroxiureia como parte do tratamento da anemia falciforme apresentou influência nos níveis de PCR e LDH, reduzindo os níveis desses marcadores nos indivíduos que faziam uso do medicamento, porém não foi verificada influência nos níveis de IL-8 e IL-1 β . Apesar disso, os níveis de PCR e LDH nos indivíduos HbSS que utilizavam o medicamento como parte da terapia, permaneceram significativamente maiores em comparação aos doadores saudáveis.

Por fim, a avaliação dos resultados de genotipagem em conjunto com a dosagem dos marcadores de inflamação e hemólise, demonstrou que apenas os níveis de IL-8 foram estatisticamente diferentes entre os genótipos, com os maiores níveis identificados nos indivíduos mutados em homozigose.

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que existe associação entre a mutação em GATA-1 e os níveis de IL-8 na doença falciforme, sem influência da mutação em outros marcadores de inflamação e hemólise.

REFERÊNCIAS

ABDUL-HUSSEIN, H. K.; AL-MAMMORI, H. S.; HASSAN, M. K. Evaluation of the expression of red blood cell CD36, interleukin-6 and interleukin-8 in sickle cell anemia pediatric patients. **Cytokine**, v. 143, p. 155534, jul. 2021.

ADAM, S. S. et al. Markers of Coagulation Activation and Inflammation in Sickle Cell Disease and Sickle Cell Trait. **Blood**, v. 112, n. 11, p. 4813–4813, 16 nov. 2008.

ALAGBE, A. E. et al. Anti-inflammatory cytokines in sickle cell disease. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 3, p. 2433–2442, 9 mar. 2022.

ALAYASH, A. I. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 70, p. 78–86, maio 2018.

AN, R. et al. Sickle red blood cell-derived extracellular vesicles activate endothelial cells and enhance sickle red cell adhesion mediated by von Willebrand factor. **British Journal of Haematology**, v. 201, n. 3, p. 552–563, 1 maio 2023.

ANSARI, J.; GAVINS, F. N. E. Ischemia-Reperfusion Injury in Sickle Cell Disease. **The American Journal of Pathology**, v. 189, n. 4, p. 706–718, abr. 2019.

ARCHER, N. M. et al. F-erythrocytes promote *Plasmodium falciparum* proliferation in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 98, n. 10, p. 1598–1605, 16 out. 2023.

BALLAS, S. K. Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell disease. **Blood**, v. 121, n. 1, p. 243–244, 3 jan. 2013.

BANDEIRA, I. C. J. et al. Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB*S haplotype. **Cytokine**, v. 65, n. 2, p. 217–221, fev. 2014.

BATCHELOR, J. D. et al. Red Blood Cell Invasion by *Plasmodium vivax*: Structural Basis for DBP Engagement of DARC. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 1, p. e1003869, 9 jan. 2014.

BELCHER, J. D. et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. **Blood**, v. 123, n. 3, p. 377–390, 16 jan. 2014.

BESTER, J.; MATSHAILWE, C.; PRETORIUS, E. Simultaneous presence of hypercoagulation and increased clot lysis time due to IL-1 β , IL-6 and IL-8. **Cytokine**, v. 110, p. 237–242, out. 2018.

BESTER, J.; PRETORIUS, E. Effects of IL-1 β , IL-6 and IL-8 on erythrocytes, platelets and clot viscoelasticity. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 32188, 26 ago. 2016.

BOUCHNITA, A. et al. Modeling of the effects of IL-17 and TNF- α on endothelial cells and thrombus growth. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 11–12, p. 456–473, nov. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Doença falciforme: Condutas básicas para tratamento. **Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde**. Brasília, 2012.

BUEHLER, P. W.; HUMAR, R.; SCHAER, D. J. Haptoglobin Therapeutics and Compartmentalization of Cell-Free Hemoglobin Toxicity. **Trends in Molecular Medicine**, v. 26, n. 7, p. 683–697, jul. 2020.

BUNN, F. H. Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. **The New England Journal of Medicine**, v.11, p. 762-769, 1997.

CHARACHE, S. et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 79, n. 10, p. 2555–65, 15 maio 1992.

CHENOU, F. et al. Effect of hydroxyurea therapy on intravascular hemolysis and endothelial dysfunction markers in sickle cell anemia patients. **Annals of Hematology**, v. 100, n. 11, p. 2669–2676, 28 nov. 2021.

CRAWFORD, K. S.; VOLKMAN, B. F. Prospects for targeting ACKR1 in cancer and other diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 15 mar. 2023.

DARBARI, D. S.; SHEEHAN, V. A.; BALLAS, S. K. The vaso-occlusive pain crisis in sickle cell disease: Definition, pathophysiology, and management. **European Journal of Haematology**, v. 105, n. 3, p. 237–246, 19 set. 2020.

DAVIS, M. B. et al. Distinct Transcript Isoforms of the Atypical Chemokine Receptor 1 (ACKR1) / Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC) Gene Are Expressed in Lymphoblasts and Altered Isoform Levels Are Associated with Genetic Ancestry and the Duffy-Null Allele. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0140098, 16 out. 2015.

DE FREITAS DUTRA, V. et al. Genetic contribution and functional impairment of inflammasome in sickle cell disease. **Cytokine**, v. 149, p. 155717, jan. 2022.

DO AMARAL, B. et al. Discriminação alélica em ovinos naturalizados do Pantanal Sul-Matogrossense por meio de marcadores microssatélites. **Journal of the Selva Andina Research Society**, v. 3, p. 3-13, 2012.

DOMINGOS, I. F. et al. High levels of proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8 are associated with a poor clinical outcome in sickle cell anemia. **Annals of Hematology**, v. 99, n. 5, p. 947–953, 5 maio 2020.

DRASAR, E. R. et al. The effect of Duffy antigen receptor for chemokines on severity in sickle cell disease. **Haematologica**, v. 98, n. 8, p. e87–e89, 1 ago. 2013.

DWORKIS, D. A. et al. Severe sickle cell anemia is associated with increased plasma levels of TNF-R1 and VCAM-1. **American Journal of Hematology**, v. 86, n. 2, p. 220–223, 21 fev. 2011.

ERDEI, J. et al. Induction of NLRP3 Inflammasome Activation by Heme in Human Endothelial Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1–14, 2018.

FEUGRAY, G. et al. Lactate dehydrogenase and hemolysis index to predict vaso-occlusive crisis in sickle cell disease. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 21198, 1 dez. 2023.

GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 4, p. 232–241, 23 abr. 2010.

GARCIA, N. P. et al. Sick Cell Anemia Patients Display an Intricate Cellular and Serum Biomarker Network Highlighted by TCD4+CD69+ Lymphocytes, IL-17/MIP-1 β , IL-12/VEGF, and IL-10/IP-10 Axis. **Journal of Immunology Research**, v. 2020, p. 1–22, 8 jan. 2020.

GASSNER, C. et al. RHD/CE typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. **Transfusion**, v. 37, n. 10, p. 1020–1026, 27 out. 1997.

GOMES, I. C. P. et al. Levels of inflammatory markers are differentially expressed in sickle cell anemia and sickle cell trait. **eJHaem**, v. 4, n. 3, p. 705–709, 26 ago. 2023.

GUARDA, C. C. et al. Hydroxyurea alters circulating monocyte subsets and dampens its inflammatory potential in sickle cell anemia patients. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 14829, 15 out. 2019.

GUELSIN, G. A. S. et al. Genetic polymorphisms of Rh, Kell, Duffy and Kidd systems in a population from the State of Paraná, southern Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 1, p. 21–25, 2010.

GUPTA, A. et al. IL-18 mediates sickle cell cardiomyopathy and ventricular arrhythmias. **Blood**, v. 137, n. 9, p. 1208–1218, 4 mar. 2021.

HA, E. T. et al. The Relationship of Duffy Gene Polymorphism, High Sensitivity C-Reactive Protein, and Long-term Outcomes. **medRxiv : the preprint server for health sciences**, 8 ago. 2023.

HEBBEL, R. P.; BELCHER, J. D.; VERCELLOTTI, G. M. The multifaceted role of ischemia/reperfusion in sickle cell anemia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 3, p. 1062–1072, 2 mar. 2020.

HÖHER, G.; FIEGENBAUM, M.; ALMEIDA, S. Molecular basis of the Duffy blood group system. **Blood transfusion**, v. 16, n. 1, p. 93–100, jan. 2018.

HOWES, R. E. et al. The global distribution of the Duffy blood group. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, p. 266, 5 abr. 2011.

JENKINS, B. D. et al. Atypical Chemokine Receptor 1 (*DARC/ACKR1*) in Breast Tumors Is Associated with Survival, Circulating Chemokines, Tumor-Infiltrating Immune Cells, and African Ancestry. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 28, n. 4, p. 690–700, 1 abr. 2019.

KALRA, V. K. et al. Placenta growth factor mediated gene regulation in sickle cell disease. **Blood Reviews**, v. 32, n. 1, p. 61–70, jan. 2018.

KARSTEN, E.; BREEN, E.; HERBERT, B. R. Red blood cells are dynamic reservoirs of cytokines. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3101, 15 fev. 2018.

KARSTEN, E.; HERBERT, B. R. The emerging role of red blood cells in cytokine signalling and modulating immune cells. **Blood Reviews**, v. 41, p. 100644, maio 2020.

KATO, G. J. et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 107, n. 6, p. 2279–2285, 15 mar. 2006.

KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 18010, 15 mar. 2018.

KAUL, D. K.; FINNEGAN, E.; BARABINO, G. A. Sickle Red Cell–Endothelium Interactions. **Microcirculation**, v. 16, n. 1, p. 97–111, 26 jan. 2009.

KAUR, S. et al. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 5, p. 115327, mar. 2020.

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

KUCUKAL, E. et al. Red blood cell adhesion to heme-activated endothelial cells reflects clinical phenotype in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 93, n. 8, p. 1050–1060, 16 ago. 2018.

LANDY, E. et al. Biological and clinical roles of IL-18 in inflammatory diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 20, n. 1, p. 33–47, 11 jan. 2024.

LANGHI JÚNIOR, D. et al. Serological and Molecular Study of the Duffy Blood Group among Malarial Endemic Region Residents in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2022.

LI, W. et al. Identifying Inflammatory and Immune Markers Associated with Vasoocclusive Crisis in Patients with Sickle Cell Disease. **Blood**, v. 142, n. Supplement 1, p. 3868–3868, 28 nov. 2023.

LI, W. et al. Inflammation and autoimmunity are interrelated in patients with sickle cell disease at a steady-state condition: implications for vaso-occlusive crisis, pain, and sensory sensitivity. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 1 fev. 2024.

LIU, Y. et al. Role of MCP-1 as an inflammatory biomarker in nephropathy. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 4 jan. 2024.

LIU, Z. et al. Genotyping for Kidd, Kell, Duffy, Scianna, and RHCE blood group antigens polymorphisms in Jiangsu Chinese Han. **Chinese medical journal**, v. 125, n. 6, p. 1076–81, mar. 2012.

LOPEZ, G. H. et al. Duffy blood group phenotype–genotype correlations using high-resolution melting analysis PCR and microarray reveal complex cases including a new null *FY*A* allele: the role for sequencing in genotyping algorithms. **Vox Sanguinis**, v. 109, n. 3, p. 296–303, 20 out. 2015.

LUBECK, D. et al. Estimated Life Expectancy and Income of Patients With Sickle Cell Disease Compared With Those Without Sickle Cell Disease. **JAMA Network Open**, v. 2, n. 11, p. e1915374, 15 nov. 2019.

MAHESHWARI, A.; KILLEEN, R. B. Duffy Blood Group System. Continuing Education Activity. **Stat Pearls**, 2023.

MAMAS, T. et al. Hemoglobinopathies and preimplantation diagnostics. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 44, n. S1, p. 21–27, 20 set. 2022.

MAN, S. M.; KARKI, R.; KANNEGANTI, T. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. **Immunological Reviews**, v. 277, n. 1, p. 61–75, 30 maio 2017.

MANGALMURTI, N. S. et al. Loss of red cell chemokine scavenging promotes transfusion-related lung inflammation. **Blood**, v. 113, n. 5, p. 1158–66, 29 jan. 2009.

MANWANI, D.; FRENETTE, P. S. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. **Blood**, v. 122, n. 24, p. 3892–3898, 5 dez. 2013.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome. **Molecular Cell**, v. 10, n. 2, p. 417–426, ago. 2002.

MARTINS, M. L. et al. Duffy blood group system: New genotyping method and distribution in a Brazilian extra-Amazonian population. **Molecular and Cellular Probes**, v. 35, p. 20–26, out. 2017.

MECABO, G. et al. Duffy-negative is associated with hemolytic phenotype of sickle cell anemia. **Clinical Immunology**, v. 136, n. 3, p. 458–459, set. 2010.

MECABO, G. et al. Lactate dehydrogenase isoenzyme 3 and hemolysis in sickle cell anemia: a possible correlation? **Blood**, v. 125, n. 24, p. 3821–3822, 11 jun. 2015.

NADER, E.; ROMANA, M.; CONNES, P. The Red Blood Cell—Inflammation Vicious Circle in Sickle Cell Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 13 mar. 2020.

NASCIMENTO, T. S. DO et al. Metemoglobinemia: do diagnóstico ao tratamento. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 58, n. 6, p. 651–664, dez. 2008.

NEBOR, D. et al. Association between Duffy antigen receptor for chemokines expression and levels of inflammation markers in sickle cell anemia patients. **Clinical Immunology**, v. 136, n. 1, p. 116–122, jul. 2010.

OLATUNYA, O. S. et al. Red blood cells microparticles are associated with hemolysis markers and may contribute to clinical events among sickle cell disease patients. **Annals of Hematology**, v. 98, n. 11, p. 2507–2521, 6 nov. 2019.

OLSSON, M. L. et al. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. **Transfusion**, v. 38, n. 2, p. 168–173, 19 fev. 1998.

ORTEGA, D. C. et al. Ancestral reconstruction and correlation of the frequencies of the hemoglobin *S* allele and the *D*uffy blood group alleles in human populations. **American Journal of Human Biology**, v. 35, n. 3, 14 mar. 2023.

PAULING, L. et al. Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. **Science**, 1949.

PIEL, F. B. et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. **Nature Communications**, v. 1, n. 1, p. 104, 2 nov. 2010.

PIEL, F. B. et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. **The Lancet**, v. 381, n. 9861, p. 142–151, jan. 2013a.

PIEL, F. B. et al. Global Burden of Sickle Cell Anaemia in Children under Five, 2010–2050: Modelling Based on Demographics, Excess Mortality, and Interventions. **PLoS Medicine**, v. 10, n. 7, p. e1001484, 16 jul. 2013b.

PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1561–1573, 20 abr. 2017.

PITANGA, T. N. et al. Cytokine profiles in sickle cell anemia: Pathways to be unraveled. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 04, n. 07, p. 6–12, 2013.

QUINN, C. T. et al. Biochemical surrogate markers of hemolysis do not correlate with directly measured erythrocyte survival in sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 12, p. 1195–1201, 8 dez. 2016.

RAPPOPORT, N. et al. The Duffy antigen receptor for chemokines, *ACKR1* – ‘Jeanne DARC’ of benign neutropenia. **British Journal of Haematology**, v. 184, n. 4, p. 497–507, 27 fev. 2019.

SAAH, E. et al. Sickle Cell Disease Pathophysiology and Related Molecular and Biophysical Biomarkers. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 36, n. 6, p. 1077–1095, dez. 2022.

SALES, R. R.; NOGUEIRA, B. L.; LUIZON, M. R. Pharmacogenomics of Hydroxyurea Therapy and Fetal Hemoglobin Levels in Sickle Cell Anemia. **Pharmacogenomics**, v. 23, n. 7, p. 393–396, 12 maio 2022.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2 Ed. New York: Cold Spring Laboratory, 9.16-9.23, 1989.

SAMUS, M.; ROT, A. Atypical chemokine receptors in cancer. **Cytokine**, v. 176, p. 156504, abr. 2024.

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

SANTOS, T. G. et al. Origem da Relação entre Malária e Anemia Falciforme / Origin of the Relationship Between Malaria and Sickle Cell Anemia. ID on line. **Revista de psicologia**, v. 16, n. 61, p. 128–140, 31 jul. 2022.

SCHNOG, J. B. et al. Duffy Phenotype Does Not Influence the Clinical Severity of Sickle Cell Disease. **Clinical Immunology**, v. 96, n. 3, p. 264–268, set. 2000.

SILVA, M.; FAUSTINO, P. From Stress to Sickle and Back Again–Oxidative/Antioxidant Mechanisms, Genetic Modulation, and Cerebrovascular Disease in Children with Sickle Cell Anemia. **Antioxidants**, v. 12, n. 11, p. 1977, 7 nov. 2023.

SILVA-JUNIOR, A. L. et al. Immunological Hallmarks of Inflammatory Status in Vaso-Occlusive Crisis of Sickle Cell Anemia Patients. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 11 mar. 2021.

SILVA-PINTO, A. C. et al. Economic burden of sickle cell disease in Brazil. **PLOS ONE**, v. 17, n. 6, p. e0269703, 16 jun. 2022.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. 1, p. 263–292, 24 jan. 2019.

TEIXEIRA, R. S. et al. Associations between endothelial dysfunction and clinical and laboratory parameters in children and adolescents with sickle cell anemia. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0184076, 1 set. 2017.

THAKUR, D. D. S. et al. Effectiveness of Hydroxyurea Therapy in Sickle Cell Disease and Sickle Cell Trait. **Journal of Medical Science And clinical Research**, v. 7, n. 8, 13 ago. 2019.

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

TOURNAMILLE, C. et al. **Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals.** *Nature Genetics*, v.10, p. 224-228, 1995.

VELÁSQUEZ, I. M. et al. Duffy antigen receptor genetic variant and the association with Interleukin 8 levels. **Cytokine**, v. 72, n. 2, p. 178–184, abr. 2015.

VINCHI, F. Not All Heme is “Free” in Sickle Cell Disease. **HemaSphere**, v. 7, n. 7, p. e910, jul. 2023.

VONA, R. et al. Sickle Cell Disease: Role of Oxidative Stress and Antioxidant Therapy. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 296, 16 fev. 2021.

WAGDY, R. et al. Altered ventricular longitudinal strain in children with sickle cell disease: Role of TGF- β and IL-18. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 71, n. 1, 6 jan. 2024.

WASKOW, G. et al. Genetic variability of blood groups in southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 2, 2020.

WERTHEIMER, S. P.; BARNWELL, J. W. Plasmodium vivax interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: Identification of a parasite receptor-like protein. **Experimental Parasitology**, v. 69, n. 3, p. 340–350, out. 1989.

WILLIAMS, T. N.; WEATHERALL, D. J. World Distribution, Population Genetics, and Health Burden of the Hemoglobinopathies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 9, p. a011692–a011692, 1 set. 2012.

YAO, S. et al. Genetic ancestry and population differences in levels of inflammatory cytokines in women: Role for evolutionary selection and environmental factors. **PLOS Genetics**, v. 14, n. 6, p. e1007368, 7 jun. 2018.

YAZDI, A. S.; GHORESCHI, K. The Interleukin-1 Family. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 941, p. 21–29, 2016.

ZACARIAS, J. M. V. et al. Profile of Rh, Kell, Duffy, Kidd, and Diego blood group systems among blood donors in the Southwest region of the Paraná state, Southern Brazil. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 55, n. 3, p. 302–307, dez. 2016.

ZHRAN, A. M. et al. Effect of Hydroxyurea Treatment on the Inflammatory Markers Among Children With Sickle Cell Disease. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 26, p. 107602961989511, 1 jan. 2020.

ZHANG, D. et al. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 801–809, 18 fev. 2016.