



BAHIANA
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
MEDICINA E SAÚDE HUMANA**

ROZANA DOS SANTOS TEIXEIRA

**NÍVEIS DE CITOCINAS E PERFIL LIPÍDICO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES
COM ANEMIA FALCIFORME: ASSOCIAÇÃO COM DISFUNÇÃO ENDOTELIAL,
MARCADORES DE HEMÓLISE E EVENTOS CLÍNICOS**

TESE DE DOUTORADO

**Salvador
2018**

ROZANA DOS SANTOS TEIXEIRA

**NÍVEIS DE CITOCINAS E PERFIL LIPÍDICO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES
COM ANEMIA FALCIFORME: ASSOCIAÇÃO COM DISFUNÇÃO ENDOTELIAL,
MARCADORES DE HEMÓLISE E EVENTOS CLÍNICOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Medicina e Saúde Humana.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marice
Teixeira Ladeia

Coorientadora: Profa. Dra. Regina Terse
Ramos

Salvador
2018

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas

T266 Teixeira, Rozana dos Santos

Níveis de citocinas, perfil lipídico e a associações com hemólise, disfunção endotelial e eventos clínicos em crianças e adolescentes com anemia falciforme. / Rozana dos Santos Teixeira. – 2018.
159f.: il. Color; 30cm.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marice Teixeira Ladeia

Coorientadora: Regina Terse Ramos

Doutora em Medicina e Saúde Humana.

Inclui bibliografia

1. Crianças e adolescentes. 2. Disfunção endotelial. 3. Anemia falciforme.
4. Vasculopatia.

I. Título.

CDU: 616.155.194

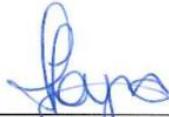
ROZANA DOS SANTOS TEIXEIRA

“NÍVEIS DE CITOCINAS E PERFIL LIPÍDICO EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME. ASSOCIAÇÃO COM DISFUNÇÃO ENDOTELIAL, MARCADORES DE HEMÓLISE E EVENTOS CLÍNICOS”

Tese apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Medicina e Saúde Humana.

Salvador, 31 de agosto de 2018.

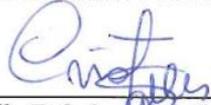
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr.^a Isa Menezes Lyra
Doutora em Medicina e Saúde
Universidade Salvador, UNIFACS



Prof^a. Dr.^a Teresa Cristina Martins Vicente Robazzi
Doutora em Medicina e Saúde
Universidade Federal da Bahia, UFBA



Prof^a. Dr.^a Iza Cristina Salles de Castro
Doutora em Medicina e Saúde
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMS



Prof^a. Dr.^a Caroline Alves Feitosa
Doutora em Saúde Coletiva
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMS



Prof. Dr. Marcos Antônio Almeida Matos
Doutor em Ortopedia e Traumatologia
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMS

Dedico este trabalho a minha família, núcleo de aprendizado, onde praticamos as virtudes a serem conquistadas e descobrimos as paixões que necessitam do esforço educativo.

AGRADECIMENTOS

“ O verdadeiro bem estar consiste em cada um empregar o seu tempo como lhe apraza e não na execução de trabalhos pelos quais nenhum gozo sente. ”

Livro dos Espíritos

A todos que comungaram comigo a realização este trabalho, empregando o seu tempo, sua generosidade, conhecimento e labor, os meus sinceros e eternos agradecimentos.

A minha orientadora Ana Marice, um agradecimento especial por ter levantado meu ânimo nos momentos difíceis, por ter visto mais além do que eu conseguiria, por sua capacidade de liderança, entusiasmo, confiança, visão empreendedora, minha admiração e amizade nascida na cumplicidade de objetivos.

A minha co-orientadora. Profa. Regina Terse, profissional exemplar, companheira e um ser humano inspirador.

A Tatiana Ferreira, companheira na coleta de dados e construção do banco de dados

A Prof. Ney Boa-Sorte, grande colaborador nos acertos finais da estatística

A Profa. Isa Lyra que gentilmente nos acolheu em seu ambulatório, compartilhando conosco seus pacientes.

A Prof. Bruno Bezerril Andrade, imprescindível apoio na análise das citocinas, nas publicações dos artigos, na análise de dados, sempre de forma ágil, objetiva e gentil.

Aos meus pais, que se orgulham da profissão que escolhi, ao tempo em que se preocupam com minha saúde e bem-estar

A Mozart, meu companheiro, pelas longas horas em que estive silenciosa ao seu lado, luzes acesas noite a dentro, lendo, pensando e escrevendo

Aos meus filhos Ismael, Rafael, Ester e João Victor por terem permitido a oportunidade de ser sua mãe

Aos meus netos Joaquim, Davi, Alice e meu neto adotivo Luquinhas, por encherem as pausas do trabalho incessante de alegria e luz.

A minha avó Bela e meu avô Claudionor *in memoriam*

A Valma, pediatra exemplar e amiga querida pela generosa contribuição na captação de pacientes para esta pesquisa.

À equipe da pesquisa: Dra. Tatiana Ferreira, Dra. Cristina Sales, Dra. Mara Risatto, os acadêmicos Isa Perdiz, Mariana Motta, Mariana Maia, Francianne Ribeiro, Sullivan Miranda, Vinícius Machado serei eternamente grata pela cooperação e parceria.

Aos pacientes da pesquisa e suas famílias, o meu respeito e gratidão.

A Deus causa de todas as coisas, meu Criador, diante de quem me reconheço criatura.

*As adversidades despertam em nós
capacidades que, em circunstâncias
favoráveis, teriam ficado adormecidas”*

Horácio

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

EBMSP - Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

FMB - Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia

HEMOBA – Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia

HGRS – Hospital Geral Roberto Santos

FONTE DE FINANCIAMENTO

FAPESB – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia

RESUMO

Introdução: Disfunção endotelial, inflamação crônica e alterações no perfil lipídico (PL) integram a fisiopatologia da Anemia Falciforme (AF). Associações entre estes mecanismos e manifestações clínicas podem definir perfis de gravidade e colaborar para melhor compreensão da doença. **Objetivos:** Avaliar o nível de citocinas e o PL em crianças e adolescentes com AF e sua associação com variáveis clínicas e laboratoriais; comparar o nível de citocinas e o PL entre falcêmicos tratados e não tratados com hidroxiuréia (HDX). **Métodos:** Estudo transversal, envolvendo 55 crianças e adolescentes estáveis com hemoglobina SS, das quais 24 em uso de HDX e 41 crianças e adolescentes saudáveis, de 6 a 18 anos de idade. Realizadas dosagem das Interleucinas (IL) 1 β , 6, 8, 10, 12pq, 17A e TNF- α ; dosagem do colesterol total, triglicérides (TG), LDL-C e HDL-C; dosagem de proteína C reativa de alta sensibilidade (PCRas). A função endotelial foi avaliada através da vasodilatação mediada por fluxo (VMF) da artéria braquial. Dados do doppler transcraniano foram obtidos em consulta ao prontuário. Análise de cluster hierárquico (CH) foi realizado para avaliar a diferença entre os grupos. **Resultados:** A idade e o sexo foram semelhantes entre os grupos AF HDX não; AF HDX sim e grupo controle ($p=0,054$ e $p=0,115$ respectivamente). A análise de CH demonstrou predomínio de marcadores inflamatórios (IL, PCR as, leucócitos) no grupo AF. As citocinas IL-17A e IL-8 apresentaram correlação positiva com número de crises vasoclusivas (CVO) e TNF- α com número de transfusões sanguíneas. O grupo AF apresentou níveis de colesterol total (CT), LDL-c e HDL-c baixos, TG/HDL-c e TG elevados comparados ao grupo saudável. TG/ HDL-c se correlacionou positivamente com LDH (r^s 0,30 $p=0,047$), com contagem de leucócitos (r^s 0,40 $p=0,006$), com velocidade do fluxo sanguíneo na artéria cerebral direita (r^s 0,35 $p=0,037$) e esquerda (r^s 0,361 $p=0,026$). CT se correlacionou negativamente com PCR as (r^s -0,3 $p=0,04$) e LDL-c com total de transfusão sanguínea (r^s -0,3 $p=0,032$). Falcêmicos com TG/HDL-c acima de 2,73 mg/dl apresentaram mais Síndrome Torácica Aguda 70,6% vs 29,4% $p=0,027$, com chance de 3,77 vezes, IC95%(1,135- 12,53) para este evento. Identificado três subfenótipos: hemolítico, grupo AF HDX não; inflamatório, grupo AF HDX sim; grupo saudável com função endotelial preservada, ausência de anemia, níveis mais elevados de IL-10. **Conclusões:** Crianças e adolescentes com AF tratados com HDX, potencialmente mais graves, apresentaram perfil inflamatório que se associou a CVO, demonstrando o envolvimento das citocinas na patogênese da AF. Pacientes não tratados com HDX apresentaram perfil hemolítico associado a elevação dos níveis de TG/HDL-c, demonstrando a associação entre metabolismo lipídico e hemólise. TG/HDL-C desponta como marcador de lesão vascular através das associações com marcadores de hemólise, inflamação, manifestações agudas e complicações da doença.

Palavras chaves: Anemia Falciforme. Disfunção endotelial. Citocinas. Lipídios. Lipoproteínas. Inflamação. Vasculopatia. Velocidade mediada por fluxo. Crianças e adolescentes.

ABSTRACT

Introduction: Endothelial dysfunction, chronic inflammatory process and changes in the lipid profile are part of the pathophysiology of sickle cell anemia (SCA). Associations between these mechanisms and clinical manifestations can define severity profiles and collaborate to a better understanding of the disease.

Objectives: To evaluate the level of cytokines and the lipid profile in children and adolescents with SCA, comparing to healthy controls and their association with clinical and laboratory variables; to compare the level of cytokines and the lipid profile between treated and untreated patients with hydroxyurea (HDX).

Material and Methods: A cross-sectional study involving 55 stable children and adolescents with hemoglobin SS, 24 of them using HDX and 41 healthy children aged 6 to 18 years. Interleukins (IL) 1 β , 6, 8, 10, 12pq, 17A and TNF- α were measured as well as total cholesterol, triglycerides (TG), LDL-C and HDL-C; high sensitivity C-reactive protein. Endothelial function was assessed through flow-mediated vasodilation (VMF) of the brachial artery. Data from the transcranial Doppler were obtained in the medical record. Hierarchical cluster analysis, was performed to assess the difference between groups.

Results: The age and the sex was similar between the groups HDX no treated, HDX treated and control group ($p=0,054$ and $p=0,115$ respectively). Hierarchical cluster analysis demonstrated a predominance of inflammatory markers (IL, CRP, as leukocytes) in the SCA group. Cytokines IL-17A and IL-8 showed a positive correlation with CVO number and TNF- α with blood transfusions. The SCA group had lower levels of total cholesterol, LDL-c, and HDL-c and higher TG / HDL-c and TG when compared to the healthy group. The TG / HDL-c ratio correlated positively with LDH (r_s 0.30 $p = 0.047$), leukocyte count (r_s 0.40 $p = 0.006$), blood flow velocity in the right cerebral artery (r_s 0.35 $p = 0.037$) left cerebral artery (r_s 0.361 $p = 0.026$). Total cholesterol was negatively correlated with CRP (r_s -0.3 $p = 0.04$) and LDL-c with total blood transfusion (r_s -0.3 $p = 0.032$). Patients with TG / HDL-c above 2.73 mg / dL showed more STA 70.6% vs 29.4% $p = 0.027$, odds ratio 3.77, 95% CI (1,135-12, 53). Three subphenotypes were identified: hemolytic, formed by HDX non-treated SCA; inflammatory profile formed by HDX-treated SCA; healthy phenotype with preserved endothelial function, absence of anemia, and higher levels of IL-10, formed by comparison group.

Conclusions: Children and adolescents using HDX, potentially worse, presented an inflammatory profile that has been associated with VOE, suggesting the involvement of cytokines in the SCA pathogenesis. Patients not treated with HDX presented a hemolytic profile that was associated with elevated levels TG / HDL-c ratio, demonstrating the association between lipid metabolism and hemolysis in SCA. TG / HDL-C appears as a marker of vascular lesion, either because of its association with markers of hemolysis, inflammation, acute manifestations and complications of the disease.

Key words: Sickle cell anemia. Endothelial dysfunction. Cytokines. Lipids. Proteins. Inflammation. Vasculopathy. Flow mediated velocity. Children and adolescents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Base genética da Hemoglobina S e a polimerização	15
Figura 2 - Estrutura da hemoglobina normal	20
Figura 3 - Desenho das alterações da membrana do eritrócito em foice	25
Figura 4 - Esquema dos mecanismos fisiopatológicos e manifestações clínicas da Anemia Falciforme	26
Figura 5 - Mapa com as regiões de origem dos haplótipos do gene β s e superposição com a Malária.....	27
Figura 6 - Esquema das funções do endotélio	29
Figura 7 - Representação gráfica do papel do endotélio em estado quiescente ou basal e estado ativado.	30
Figura 8 - Desenho da estrutura da lipoproteína de baixa densidade	33
Figura 9 - Esquema da estrutura da membrana plasmática.....	34
Figura 10 - Produção e interações das citocinas.....	36
Figura 11 - Representação da fisiopatologia da vasoclusão	42
Figura 12 - Mecanismo de ação da Hidroxiuréia	50
Figura 13 - Representação gráfica da gênese da vasodilatação mediada por fluxo .	52
Figura 14 - Fotografia do fluxo sanguíneo da artéria braquial no estado basal.....	63
Figura 15 - Fotografia do fluxo sanguíneo da artéria braquial no período de hiperemia reativa.....	64
Figura 16 - Fotografia do diâmetro da artéria braquial em estado basal	64
Figura 17 - Fotografia do diâmetro da artéria braquial no período de vasodilatação	65
Figura 18 - Cálculo da vasodilatação mediada por fluxo	65
Quadro 1 - Descrição das hemoglobinas produzidas nos diversos períodos da vida e local de produção	21
Quadro 2 - Fatores Moduladores da Polimerização da Hemoglobina S.....	23
Quadro 3 - Fatores de risco para eventos adversos na Anemia Falciforme.....	48
Gráfico 1 - Comparação da vasodilatação mediada por fluxo (Dilatação por fluxo) entre os grupos Anemia Falciforme em uso de HDX, não uso de HDX e grupo comparação	71
Gráfico 2 - Correlação entre TG/HDL-c e Doppler Transcraniano da artéria	75
Gráfico 3 - Correlação entre TG/HDL-c e Doppler Transcraniano da artéria	75
Gráfico 4 - Correlação TG/HDL-c e número total de leucócitos	76
Gráfico 5 - Correlação TG/HDL-c e nível de Hemoglobina	76
Gráfico 6 - Análise de cluster hierárquico, análise do componente principal e análise de vetor entre os grupos AF não tratados com Hidroxiuréia (HDX), AF tratados com HDX e grupo saudável	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Trabalhos sobre Citocinas na Anemia Falciforme.....	39
Tabela 2 - Características dos grupos estudados: Anemia Falciforme não tratados com hidroxiuréia (AF HDX não); AF tratados com HDX (AF HDX sim) e Grupo Controle.....	70
Tabela 3 - Comparação dos valores das interleucinas e da proteína C reativa entre os grupos Anemia Falciforme não tratados e tratados com HDX e grupo controle em Salvador-BA, entre junho de 2014 a março 2016.....	72
Tabela 4 - Comparação do perfil lipídico entre os grupos anemia falciforme (AF) não tratados com hidroxiuréia (AF HDX não), AF tratados com HDX (AF HDX sim) e grupo controle (GC).....	72
Tabela 5 - Comparação das manifestações clínicas entre os grupos não tratados com hidroxiuréia (HDX) e tratados com HDX em Salvador - BA de junho de 2014 a agosto de 2016.....	73
Tabela 6 - Correlações significativas entre perfil lipídico, marcadores de hemólise, marcadores de inflamação e manifestações clinicas no grupo Anemia Falciforme...	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Anemia Falciforme
AVE	Acidente vascular encefálico
CVO	Crise vasclusiva
CAR	Republica Central Africana
CT	Colesterol total
DF	Doença Falciforme
DTC	Doppler Transcraniano
DHL	Desidrogenase láctica
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
G-CSF	Fator estimulador de colônia Granulocítica
Hb	Hemoglobina
HbF	Hemoglobina fetal
HDL-C	Lipoproteína de alta densidade colesterol
HDX	Hidroxiuréia ou Hidroxicarbamida
HEMOBA	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia
HGRS	Hospital Geral Roberto Santos
ICAM – 1	Molécula de adesão intercelular
IL	Interleucina
LDH	Lactato desidrogenase
LDL-C	Lipoproteína de baixa densidade-colesterol
NO	Óxido Nítrico
PCR as	Proteína C reativa quantitativa de alta sensibilidade
SpO2	Saturação periférica da oxihemoglobina
STA	Síndrome torácica aguda
TG	Triglicérides
TG/HDL-C	Razão triglicérides/ Lipoproteína de alta densidade colesterol
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
VMF	Vasodilatação mediada por fluxo
VCAM – 1	Molécula de adesão celular vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	Primários	18
2.2	Secundário	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	O Eritrócito	19
3.2	A hemoglobina	19
3.3	A hemoglobina S	21
3.4	Polimerização da Hemoglobina S	22
3.5	Alterações moleculares da Hemoglobina S polimerizada	24
3.6	Haplótipos da hemoglobina S: definição, origem e distribuição no Brasil	26
3.7	O Endotélio	28
3.8	Hemólise e Vasculopatia	31
3.9	O Estresse oxidativo na Anemia Falciforme	31
3.10	Metabolismo Lipídico	32
3.11	Metabolismo lipídico na Anemia falciforme	34
3.12	Citocinas	35
3.12.1	Citocinas avaliadas neste estudo: produção, células alvo e ações ^(78,79)	37
3.13	Citocinas na Anemia Falciforme	37
3.13.1	Trabalhos sobre citocinas na Anemia Falciforme	39
3.14	Vasclusão	41
3.15	Resumo da Fisiopatologia da Anemia Falciforme em forma de Algoritmo	43
3.16	Manifestações Clínicas da Anemia Falciforme	44
3.17	Fatores de risco para eventos adversos na Anemia falciforme	46
3.18	A Hidroxicarbamida	49
3.19	Avaliação da Função Endotelial	51
4	DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO	54
5	CASUÍSTICA E MÉTODOS	55
5.1	Delineamento do estudo	55
5.2	Período do Estudo	55
5.3	População Alvo	55
5.4	População Acessível	55
5.5	Amostra	56
5.5.1	Técnica de Amostragem	56
5.5.2	Cálculo do tamanho amostral	56
5.6	Critérios de elegibilidade	56
5.6.1	Critérios de inclusão	56
5.6.1.1	Grupo HbSS	56
5.6.1.2	Grupo sem HbSS	57

5.6.2	Critérios de exclusão	57
5.6.2.1	<i>Grupo HbSS</i>	57
5.6.2.2	<i>Grupo sem HbSS</i>	57
5.7	Definições e Operacionalização das Variáveis	57
5.7.1	Variáveis Dependentes	57
5.7.2	Variáveis Independentes	58
5.7.2.1	<i>Variáveis clínicas e sociodemográficas</i>	58
5.7.2.2	<i>Variáveis laboratoriais</i>	58
5.7.3	Definição de eventos clínicos	59
5.7.4	Critérios de gravidade ^(125,141)	59
5.7.5	Definição de critérios de dislipidemia ⁽¹⁴²⁾	60
5.7.6	Definição de critérios para o Doppler Transcraniano ⁽¹³⁷⁾	60
5.8	Protocolo de coleta de dados	60
5.8.1	Avaliação clínica através de questionário estruturado	60
5.8.2	Exame físico	60
5.8.2.1	<i>Peso</i>	60
5.8.2.2	<i>Altura</i>	61
5.8.2.3	<i>IMC</i>	61
5.8.2.4	<i>Medida da pressão arterial (PA)</i>	61
5.8.2.5	<i>Oximetria de pulso</i>	62
5.8.3	Avaliação da função endotelial	62
5.8.4	Coleta de sangue	65
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
6.1	Hipótese científica	67
6.2	Estatística Descritiva	67
6.3	Análise Bivariada e Multivariada	67
6.4	Aspectos Éticos	68
7	RESULTADOS	69
8	DISCUSSÃO	79
9	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	85
10	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

Anemia Falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia hereditária produzida por uma mutação em ponto, no sexto códon do gene da β globina. A troca da timina por adenina na tríade de nucleotídeos GAG \rightarrow GTG (Figura 1), leva a substituição do ácido glutâmico pela valina resultando na formação de uma hemoglobina (Hb) anormal, a hemoglobina S (HbS).⁽¹⁾

Esta substituição altera as propriedades físico-químicas da hemoglobina, promovendo a polimerização da hemoglobina desoxigenada, distorção da sua arquitetura (hemácia em foice), menor sobrevivência da hemácia, de 120 dias para 10 a 12 dias,^(2,3) obstruções da microvasculatura e lesão isquêmica tecidual.

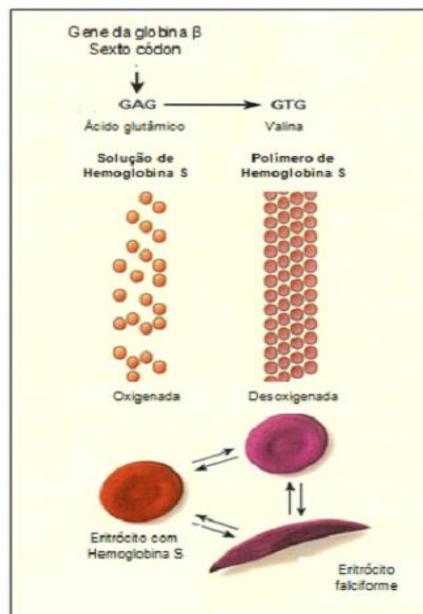


Figura 1 - Base genética da Hemoglobina S e a polimerização

Formação dos polímeros de hemoglobina e do eritrócito em foice (Steinberg; Nagel 2001)⁽⁴⁾

O termo Doença Falciforme ou Síndrome Falciforme define as hemoglobinopatias nas quais, pelo menos, uma das hemoglobinas mutantes é a Hb S. As doenças falciformes mais frequentes são a **anemia falciforme (HbSS)**, a **S β talassemia** e as duplas heterozigoses **Hb SC** e **Hb SD**.⁽⁵⁾ Também são descritas **HbSE**, **HbSOArab**, **HbS α Talassemia** ou **Smut rara**. Dentre elas a AF é a que mais se destaca por apresentar distribuição mundial⁽⁶⁾ e quadro clínico com maior gravidade.

A AF é uma doença multissistêmica, associada a episódios de adoecimento agudo, dano orgânico progressivo e morte precoce. A média de sobrevida para os homocigotos SS é de 42 anos de idade para homens e 48 anos para mulheres. Para indivíduos com HbSC a média de sobrevida para homens é 60 anos de idade e 68 anos para mulheres.⁽⁷⁾ A elevada letalidade abrangendo especialmente jovens reflete a gravidade da doença.

Estima-se que 4% da população brasileira tenha o traço falciforme no Brasil e que 25000 a 50000 pessoas tenham a doença em estado homocigótico (HbSS-anemia falciforme). A incidência é estimada em 3500 casos novos/ano.⁽⁸⁾ A Bahia é o estado com maior incidência de Doença Falciforme 1:650 nascidos vivos e de traço Falciforme 1:17 nascidos vivos.⁽⁸⁾

O único tratamento medicamentoso disponível até o momento é a hidroxiuréia (HDX) e o tratamento com possibilidade de cura é o transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH), autorizado pelo sistema único de saúde (SUS) através da Portaria nº 30, publicada em 1 de julho de 2015. Este procedimento está reservado para portadores da Anemia Falciforme com apresentação mais grave, caso possuam um doador compatível. Apesar das taxas de cura, este tratamento está sujeito a várias complicações como doença do enxerto contra hospedeiro (50% no TCTH alogênico), infecções, doença venoclusiva hepática, crise hemorrágica, complicações cardiopulmonares e complicações neurológicas.⁽⁹⁾

Disfunção endotelial é a principal consequência da polimerização da desoxi-hemoglobina S, sendo a base da vasculopatia e complicações crônicas observadas na AF. Inicia em faixa etária precoce e envolve fenômenos inflamatório, trombótico, hemolítico, oxidativo e deficiência de óxido nítrico. As citocinas participam de várias etapas deste processo. A interação da HbS com o endotélio, ativa leucócitos, plaquetas, aumenta a expressão de moléculas de adesão vascular e intercelular (VCAM-1, ICAM-1) e molécula de adesão de leucócitos endoteliais (ELAM ou E-selectina), induzidas por citocinas pró-inflamatórias.^(10,11) O estado de ativação endotelial observado nestes pacientes contribui para a formação de agregados heterocelulares aderidos à parede do vaso e oclusão vascular.⁽¹²⁾ Ciclos de isquemia e reperfusão causam estresse oxidativo, ativação de oxidases vasculares⁽¹³⁾ e aumento de citocinas inflamatórias e leucocitose.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ Alguns autores^(17,18) têm demonstrado elevação de citocinas em pacientes falcêmicos em estado estável da doença e durante episódios vasoclusivos, mas estes resultados são controversos e

pouco estudados na infância. Além disso o papel das citocinas como marcadores de gravidade tem sido pouco explorado. Marcadores de baixo grau de inflamação como leucócitos tem sido relacionado a desfechos desfavoráveis na AF como morte precoce, acidente vascular cerebral (AVC), infarto cerebral silencioso, síndrome torácica aguda, priapismo,⁽¹⁹⁻²¹⁾ e proteína C reativa de alta sensibilidade (PCRas) tem sido associada a episódios vasoclusivos dolorosos.⁽²²⁾ A avaliação de citocinas na faixa etária pediátrica pode ser útil para definir grupos com evolução desfavorável.

As informações mecanicistas sobre a hemólise e seus efeitos sobre a biologia do óxido nítrico (NO) demonstraram que a intensidade da hemólise pode ser a força motriz de algumas complicações da doença falciforme (DF) e desenvolvimento de vasculopatia.⁽²³⁾ A modulação destes mecanismos parece determinar subfenótipos da doença. Foi demonstrado que a hemólise se relaciona com hipertensão pulmonar, priapismo, ulceração de perna e AVC enquanto episódio doloroso agudo, osteonecrose e síndrome torácica aguda (STA) se relaciona com predomínio da viscosidade sanguínea e fenômenos vasoclusivos.⁽²⁴⁾

As alterações do metabolismo lipídico na AF tem sido documentado por diversos autores.⁽²⁵⁻²⁷⁾ Observa-se hipocolesterolemia, redução do LDL-C, HDL-C e elevação de triglicérides, nestes pacientes. Além disso, a razão TG/HDL-C é um importante fator de risco de doença cardiovascular⁽²⁸⁻³⁰⁾ e tem sido pouco avaliado na AF. O colesterol faz parte da membrana basal de várias células do organismo, inclusive dos eritrócitos e o maior consumo em situações de eritropoiese aumentada por hemólise crônica justifica a hipocolesterolemia observada na AF.⁽³¹⁾ Mecanismos que envolvem estresse oxidativo e oxidação do LDL-C⁽³¹⁾, aumento da oferta de ácidos graxos para o fígado com maior produção de triglicérides e diminuição da síntese de lipase lipoprotéica⁽³²⁾ estão descritos em algumas doenças inflamatórias e infecciosas mediados por citocinas e podem estar relacionadas a fisiopatologia da AF, porém não foram estudados.

As relações entre o perfil lipídico, citocinas, marcadores de hemólise, disfunção endotelial e complicações da AF, poderão ajudar a compreender a rede de mecanismos que envolvem a fisiopatologia da AF e definir novos subfenótipos da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Primários

- Testar a hipótese de que crianças e adolescentes com anemia falciforme, em estado estável da doença, apresentam elevação de citocinas e alteração do perfil lipídico quando comparadas a crianças e adolescentes saudáveis, sem hemoglobinopatia.
- Avaliar a associação entre citocinas e perfil lipídico e avaliar associações entre citocinas e perfil lipídico com marcadores de hemólise, disfunção endotelial e aspectos clínicos da doença.

2.2 Secundário

- Avaliar se existe diferença no nível de citocinas e no perfil lipídico em crianças e adolescentes com AF em tratamento ou não com hidroxiuréia.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Eritrócito

O eritrócito, hemácia ou glóbulo vermelho tem origem na medula óssea a partir de células tronco hematopoiéticas que se dividem em duas linhagens celulares: mielóide e linfoide. A linhagem mielóide dá origem a hemácia a partir do hemocitoblasto, proeritroblasto, eritroblasto, normoblasto, reticulócitos. Durante o processo de maturação estas células perdem progressivamente o núcleo e aumentam a concentração de hemoglobina. A hemácia é uma célula anucleada, em forma de disco bicôncavo com funções de transportar oxigênio, gás carbônico e tamponar íons hidrogênio. Conforme se move pela circulação precisa enfrentar intenso estresse mecânico e metabólico, deformação durante a passagem por capilares com diâmetro equivalente à metade do próprio diâmetro, resiste a altas forças de cisalhamento ao se mover através das válvulas cardíacas, sobrevive a episódios repetitivos de depleção de substrato e acidemia estase-induzida e têm de evitar a remoção pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial. Os eritrócitos também precisam manter um ambiente interno que proteja a hemoglobina do ataque oxidativo, bem como uma concentração ideal de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) necessário à função da hemoglobina. A sobrevivência do eritrócito está intimamente ligada à taxa de estresse oxidativo que a célula sofre. Na espécie humana sobrevive em torno de 120 dias.⁽³³⁾

3.2 A hemoglobina

A hemoglobina é uma molécula essencial a vida em virtude da sua função de transportar o oxigênio. Quando ligada ao gás carbônico perde sua afinidade ao oxigênio. É um tetrâmero de 64.500 dáltons formado por 2 pares de cadeias polipeptídicas, alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ), epsolon (ϵ) e zeta (ζ), ligados a 4 grupos prostéticos de ferroprotoporfirina, chamado heme, responsável pela cor vermelho do sangue. **(Figura 2)** cada tetrâmero de hemoglobina é capaz de transportar 4 moléculas de oxigênio e o fato de estar contida no interior da hemácia aumenta em até 70 vezes esta capacidade quando comparado ao transporte do oxigênio livre no plasma.

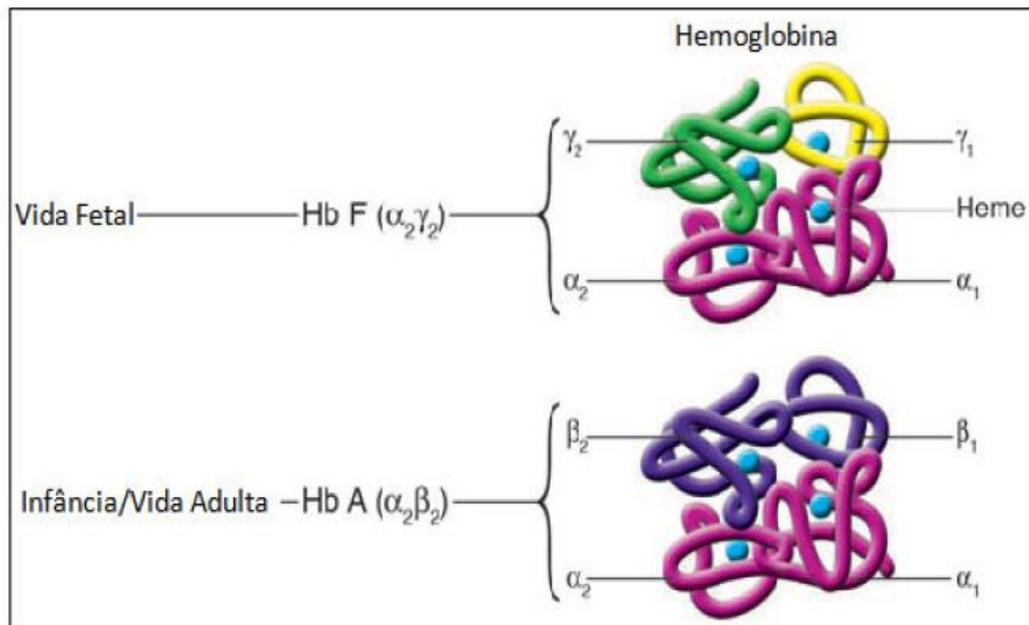


Figura 2 - Estrutura da hemoglobina normal

Fonte: Adaptado de Frenette; Atweh, 2007 ⁽³⁴⁾

Molécula de hemoglobina formada por quatro cadeias polipeptídicas ligadas aos seus respectivos grupamentos heme

As cadeias globínicas são diferentes em cada etapa da vida embrionária, fetal, infância e vida adulta, como também o órgão de produção. **(Quadro 1)** as hemoglobinas embrionárias Gower 1 ($\zeta_2\gamma_2$) Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$) são produzidas pelo saco vitelino a partir da quinta semana de gestação. Com o aumento da produção da cadeia γ a hemoglobina fetal torna-se a hemoglobina predominante da vida intrauterina como também do período neonatal. Em torno da vigésima semana de vida intrauterina o baço e a medula óssea são os principais órgãos da eritropoiese e ao nascimento a medula óssea é o principal órgão hematopoiético. A hemoglobina A principal hemoglobina da vida adulta segue com aumento progressivo da sua síntese correspondendo a 10% da hemoglobina produzida⁽²⁾ na trigésima quinta semana de gestação. A hemoglobina fetal corresponde a 60 a 80% da hemoglobina ao nascimento, diminuindo progressivamente. Atinge 3% em torno da 16^a a 20^a semanas de idade e valores semelhantes ao do adulto dos dois a quatro anos de idade. Antes do nascimento, em torno do último trimestre, a hemoglobina A₂ começa a ser produzida ⁽³⁵⁾ **(Quadro 1)**. Na vida adulta a hemoglobina A corresponde a 97% do total de hemoglobina, a hemoglobina A₂ 2,5% e a hemoglobina fetal 0,5 a 1%.⁽³⁶⁾

Quadro 1 - Descrição das hemoglobinas produzidas nos diversos períodos da vida e local de produção

Etapa da vida	Hemoglobina	Cadeias globínicas	Início e término da produção	Local de produção
Embrionário	Gower 1	$\xi 2\epsilon 2$	5ª semana até 3º mês da gestação	Saco vitelino
	Gower 2	$\alpha 2\epsilon 2$	6ª semana até 3º mês da gestação	Saco vitelino
	Hemoglobina de Portland	$\zeta 2\gamma 2$	6ª semana até 3º mês da gestação	Saco vitelino
Fetal	Hemoglobina fetal	$\alpha 2\gamma 2$	7ª semana/ 6º mês de vida	Fígado Baço
Adulto	Hemoglobina A	$\alpha 2\beta 2$	7ª a 8ª semana/vida adulta	Fígado, baço e medula óssea
	Hemoglobina A2	$\alpha 2\delta 2$	último trimestre/vida adulta	Medula óssea
	Hemoglobina F	$\alpha 2\gamma 2$		Medula óssea

3.3 A hemoglobina S

A hemoglobina S surgiu há cerca de 50 a 100 mil anos, entre os períodos paleolítico e mesolítico.⁽³⁷⁾ O fato que motivou a mutação do gene da hemoglobina normal (HbA) para o gene da hemoglobina S (HbS) ainda permanece desconhecido, porém a proteção que conferiu para os portadores AS, em relação à Malária, provavelmente contribuiu para sua perpetuação. Originária da África, distribuiu-se para outros continentes, notadamente para as Américas, a partir da migração involuntária de africanos para trabalho escravo. Permaneceu por longos anos ceifando vidas silenciosamente até ser descrita pela primeira vez em 1910, pelo médico cardiologista de Chicago – EUA, James B. Herrich, em um estudante de odontologia de 20 anos de idade, natural de Granada/ Antilhas. Apresentava anemia, icterícia recorrente, febre e ulcerações em membros inferiores, associado a eritrócitos alongados, em forma de foice no esfregaço do sangue periférico.⁽³⁸⁾ A

Bahia teve grande importância para o conhecimento da herança genética desta doença, através das pesquisas do geneticista Jessé Accioly, da Faculdade de Medicina da Bahia/Universidade Federal da Bahia, observando 21 famílias com esta patologia. Suas observações foram publicadas em 1947 na Revista *Arquivos da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia*, simultaneamente com as publicações do cientista norte-americano James V. Neel. Somente em 1973, graças aos esforços da Prof. Dra. Eliane S. Azevedo⁽³⁹⁾, foi demonstrado através de documentos científicos e carta endereçada ao editor do *American Journal of Human Genetics* dos E.U.A. a simultaneidade da descoberta, que passou a ser citada cientificamente como de Neel e Accioly.

A hemoglobina S resulta de uma mutação pontual no gene da cadeia β^s levando a substituição da base nitrogenada adenina por timina (GAG \rightarrow GTG), no sexto códon do éxon 1 no DNA do cromossomo 11. Esta alteração codifica a troca do ácido glutâmico (carga elétrica negativa) pela valina (carga neutra) na posição 6 da sequência de aminoácidos da cadeia beta globina, determinando uma hemoglobina patológica⁽³⁷⁾. A hemoglobina mutante possui propriedades físico-químicas bastante diferentes da hemoglobina normal, devido à perda de duas cargas elétricas após substituição do ácido glutâmico pela valina.

3.4 Polimerização da Hemoglobina S

No estado de oxihemoglobina, a HbS é normal, mas no estado desoxigenado, a molécula de HbS torna-se alongada e as globinas beta S ficam mais próximas, favorecendo o contato entre as regiões envolvendo a valina e receptores fenilalanina (®-85) e leucina (®-88).⁽⁴⁰⁾ Por meio da união de vários tetrâmeros de HbS forma-se um número considerável de moléculas agregadas que geram longos polímeros, alterando a morfologia do eritrócito para a forma de foice. Este fenômeno não é instantâneo e pode ser reversível se a hemoglobina voltar a se oxigenar. Alguns fatores modulam o fenômeno da polimerização. Para que as moléculas de HbS se agreguem é necessário que, além de desoxigenadas, estejam em elevada concentração, normalmente acima de 30%, o que facilita sua associação. A circulação mais lenta em alguns órgãos facilita a falcização e o aumento da viscosidade favorece a vaso-oclusão. Esta circulação lenta ocorre sobretudo no baço, provocando repetidos enfartos que levam à fibrose e destruição do órgão na

maioria dos pacientes (auto-esplenectomia).⁽⁴¹⁾ Condições que aumentam a concentração da hemoglobina corpuscular, como desidratação, aumento da osmolaridade plasmática também facilitam a polimerização da Hb S desoxigenada. A concentração da hemoglobina fetal e de hemoglobina A₂ (talassemia α) são condições que diminuem a falcização. Na vigência de acidemia há diminuição da afinidade da hemoglobina ao oxigênio favorecendo o fenômeno da polimerização. A desoxigenação é o principal facilitador da falcização, assim as condições que diminuem a tensão de oxigênio como infecções, asma, insuficiência cardíaca, choque, queda abrupta da hemoglobina, anestesia, desencadeiam a polimerização. A temperatura tem papel controverso, mas provavelmente o frio favorecendo a vasoconstrição e o calor favorecendo a desidratação tenham papel neste processo.

(Quadro 2)

Quadro 2 - Fatores Moduladores da Polimerização da Hemoglobina S

Concentração de HbS	Correlação direta entre concentração HbS e falcização.
Concentração de outras hemoglobinas na hemácia	Hb fetal e A ₂ diminuem a falcização.
Desoxigenação	É o mais importante determinante da falcização. Condições que diminuem oferta de oxigênio: Htc < 30 a 35%, infecção, insuficiência cardíaca, ventilação artificial, anestesia geral.
Estase vascular	Viscosidade da hemácia é dez vezes maior com HbS desoxigenada: impacto na estase vascular de sinusóides esplênicos e hepáticos.
Temperatura	Baixas temperaturas retardam polimerização, mas causam vasoconstrição: influência clínica limitada.
Acidose	Baixo pH diminui afinidade do O ₂ aumentando desoxigenação e polimerização.

Quadro 2 - Fatores Moduladores da Polimerização da Hemoglobina S
(Continuação)

Concentração de hemoglobina corpuscular (HCM) 7	Hiperosmolaridade aumenta a desidratação celular e polimerização.
Infecções	Associada à desidratação, hipóxia, desoxigenação, estase vascular e aumento dos efeitos inflamatórios e pró-coagulantes endoteliais.
Número de polimorfonucleares	Diretamente relacionados à isquemia tecidual, mortalidade, síndrome torácica aguda e infarto hemorrágico
Hemoglobina livre (hemólise)	Diminuição de NO, vasoconstrição e vasoclusão

Fonte: Adaptado de Martins, H.S. et al. Emergências Clínicas: Abordagem Prática, São Paulo, Manole, 2012

3.5 Alterações moleculares da Hemoglobina S polimerizada

Alterações no interior da hemácia falcizada e em sua membrana levam a um conjunto de alterações bioquímicas e moleculares. Ocorre efluxo de potássio e aumento do cálcio intracelular em virtude da alteração da bomba de sódio e potássio e falência da bomba de cálcio/ATPase. Estas alterações favorecem a perda de água, desidratação celular e aumento da densidade dos eritrócitos. Ocorre redução da deformabilidade, fragilidade e vesiculação das hemácias; oxidação da hemoglobina com formação de metemoglobina e superóxidos; desnaturação da hemoglobina com formação de heme livre e ferro livre; alterações das proteínas da membrana como banda 3, anquirina e espectrina; exposição da fosfatidil-serina e do CD36 da membrana celular. Como consequência ocorrem as seguintes alterações fisiopatológicas:

- Aumento da adesão das hemácias ao endotélio, desencadeando fenômeno inflamatório e ativação de granulócitos e plaquetas;
- Enrijecimento da membrana e de toda a hemácia, encurtando sua sobrevivência;
- Alterações microvasculares;
- Depleção de óxido nítrico, que contribuem para vasoconstrição e inflamação

- Ativação da coagulação.

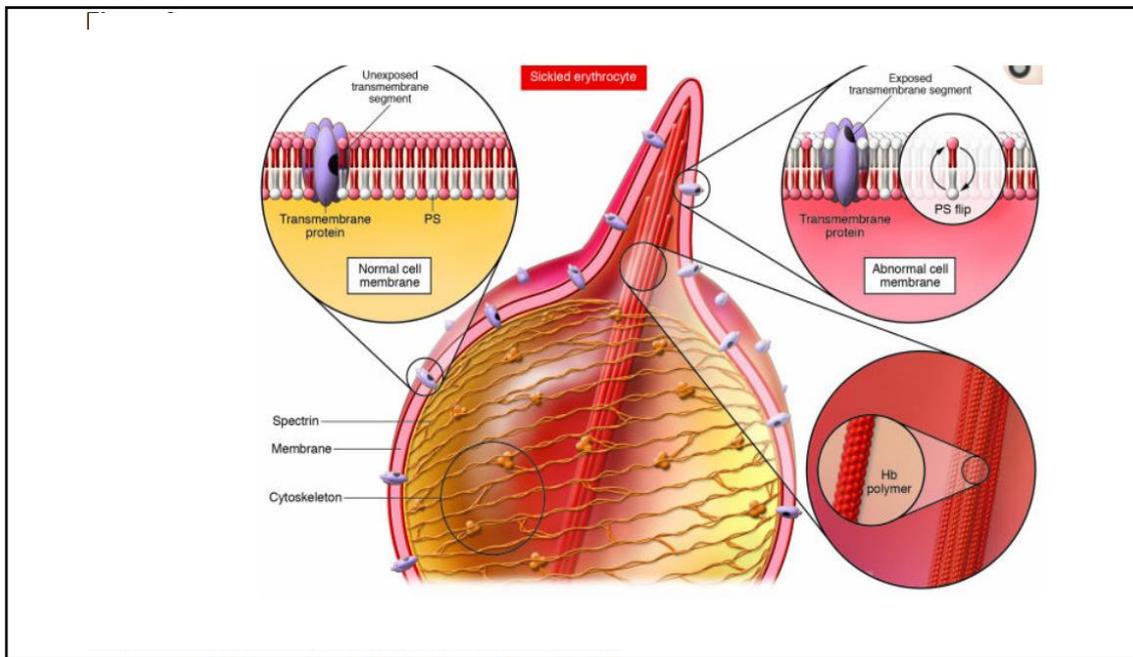


Figura 3 - Desenho das alterações da membrana do eritrócito em foice

A desoxigenação da Hb S produz alterações na forma da hemácia na qual a substituição do ácido glutâmico pela valina leva a cadeia β mutante se ligar a um sítio hidrofóbico, levando à formação de um polímero de hemoglobina. Os polímeros de hemoglobina interrompem o citoesqueleto da hemácia, formam protuberâncias, dando origem ao aspecto característico em foice. A interrupção da ligação da membrana ao citoesqueleto de proteínas resulta na exposição dos epítomos da proteína transmembrana e das trocas lipídicas, notavelmente da fosfatidilserina (PS), entre o interior e o exterior da célula. A exposição de glicolipídios carregados negativamente contribui para o estado pró-inflamatório e pró-trombótico da célula falciforme. FRENETTE e ATWEH 2005⁽³⁴⁾ A exposição da PS (fosfolipídio) na superfície da membrana, torna-a mais susceptível a apoptose.

Estas alterações justificam as manifestações clínicas observadas na Doença Falciforme e encontram-se resumidas na **Figura 4**.

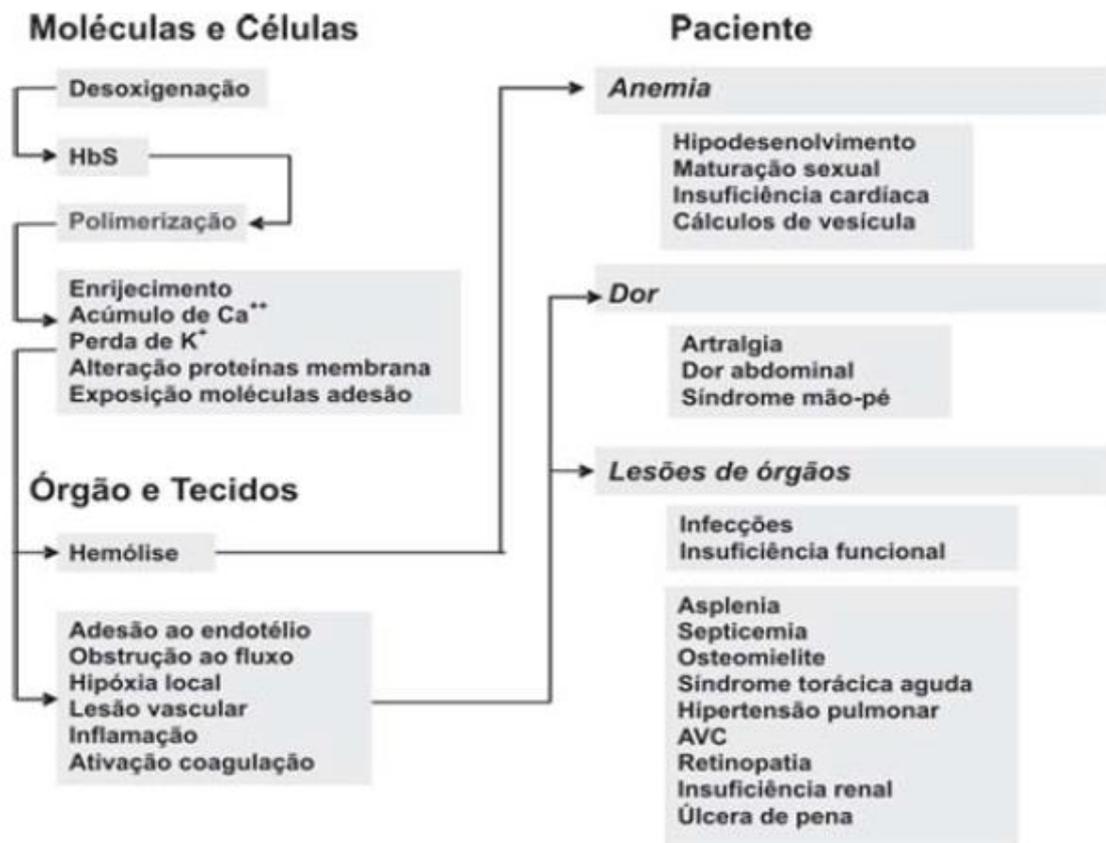


Figura 4 - Esquema dos mecanismos fisiopatológicos e manifestações clínicas da Anemia Falciforme

Fonte: Zago et al – 2007 ⁽⁴¹⁾

3.6 Haplótipos da hemoglobina S: definição, origem e distribuição no Brasil

Haplótipos do gene β^S representam polimorfismos do DNA ao longo do cromossomo 11 que podem influenciar o fenótipo da doença. Os principais haplótipos do gene β^S são o Benin (BEN), Bantu ou República Centro Africana (CAR), Camarões (CAM), Senegal (SEN) e Árabe-Indiano (ARAB) nomeados de acordo com a região geográfica e grupo étnico onde foram originalmente identificados.⁽⁴²⁾ Outros haplótipos menos comuns são designados de atípicos (Atp) e podem resultar de mutações pontuais nos sítios polimórficos de restrições, trocas entre dois haplótipos β^S ou entre haplótipos β^S e β^A .⁽⁴³⁾

O tipo Bantu originou-se no Centro-Oeste da África, o Benin na África Meridional e Oriental, o Senegal na África Ocidental Atlântica, o Arábia-Índia no subcontinente indiano e na península oriental da Arábia, e o tipo de Camarões ao

longo da costa oeste da África.⁽⁴⁴⁾ A proteção conferida por esta mutação aos infectados pela malária, endêmica nestas regiões, provavelmente contribuiu para perpetuação do gene β^s . **(Figura 5)**

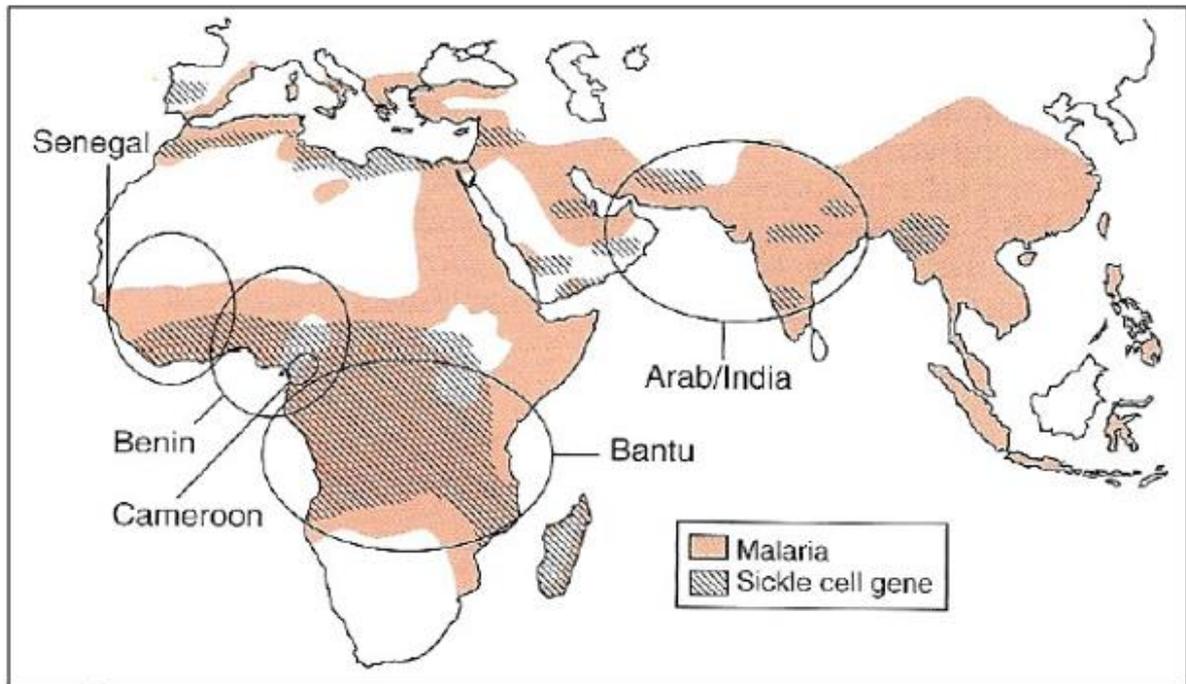


Figura 5 - Mapa com as regiões de origem dos haplótipos do gene β^s e superposição com a Malária

Fonte: Hebbel 2005⁽⁴⁵⁾

A hemoglobina fetal (Hb F) está relacionada ao haplótipo e ao curso clínico da AF.⁽⁴²⁾ Os haplótipos Senegal e Árabe-indiano apresentam as maiores produções de HbF, conferindo quadros clínicos mais benignos e menor dano orgânico. O Bantu é o haplótipo que está associado aos níveis mais elevados de Hb F e quadros clínicos de maior gravidade incluindo um risco três vezes maior de desenvolver acidente vascular cerebral, insuficiência renal, doença pulmonar crônica com cor pulmonale, úlceras nas pernas e morte de adultos jovens.⁴² Benin e Camarões produzem níveis intermediários de Hb F e quadros com gravidade.

No Brasil o haplótipo mais frequente é o Bantu, seguido do Benin.⁽⁴⁶⁾ Na Bahia há um discreto predomínio do BEN em relação ao CAR.^(47,48) Estudo realizado por Gonçalves e col.⁽⁴⁹⁾, avaliando 80 pacientes com Anemia Falciforme em Salvador-BA, demonstrou equilíbrio na prevalência dos haplótipos CAR n=77 (48.1%) e Benin n=73 (45.6%). SEN n=1 (0.63%) e atípico (Atp) n=9 (5.63%). Quanto ao genótipo esse estudo demonstrou prevalência maior do CAR/BEN 37

(46.3%), equilíbrio entre os genótipos CAR/CAR 17 (21.3%) e BEN/BEN in 17 (21.3%) e prevalência baixa de outros genótipos: BEN/SEN 1 (1.25%), BEN/Atp 1 (1.25%), CAR/Atp 6 (7.5%), Atp/Atp in 1 (1.25%). Estes resultados estão de acordo com o fato histórico da comercialização de escravos na Bahia procedente do Oeste e região central da África.

3.7 O Endotélio

O endotélio apresenta uma superfície externa não adesiva e antitrombogênica que mantêm o fluxo sanguíneo laminar. Modula o tônus vascular, através da produção de fatores relaxantes (óxido nítrico) e fatores de contração (endotelina), interferindo na resistência vascular periférica. Metaboliza a angiotensina, regula a inflamação, afeta o crescimento de outros tipos de células, em particular as células musculares lisas (**Figura 6**). Por estar presente em todos os órgãos e tecidos do organismo, realizando inúmeras funções, pode ser considerado o maior dos sistemas. Considerando um indivíduo de 70 Kg, ocupa uma área equivalente a 6 campos de tênis, peso de 1,5 kg e massa celular composta por 1 trilhão de células endoteliais.⁵⁰ Em 1954, *Rudolph Altschul referiu que «Envejecemos en la misma medida que lo hace nuestro endotelio».*⁽⁵¹⁾

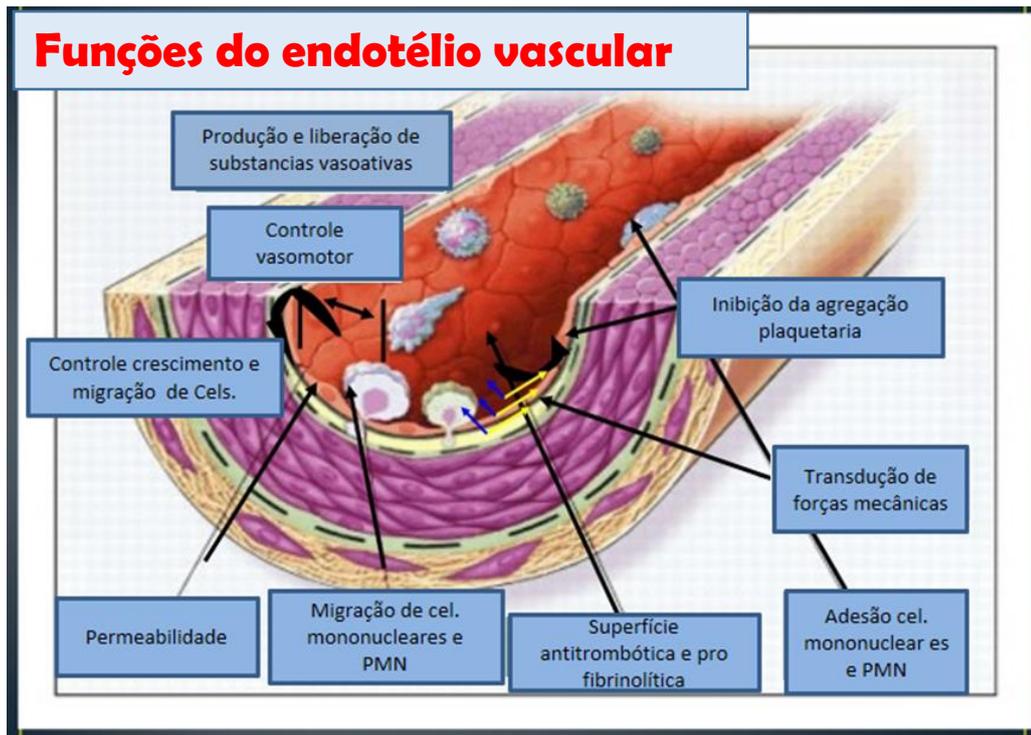


Figura 6 - Esquema das funções do endotélio

Diagrama do corte transversal do vaso sanguíneo, demonstrando as camadas da parede do vaso e as funções do endotélio.

Fonte: Rojas Rubio A. disponível em <http://slideplayer.es/slide/3230466/>⁽⁵⁰⁾

As células endoteliais podem ser ativadas pelo fluxo sanguíneo turbulento, por hipóxia, lesão endotelial, produtos bacterianos, citocinas e complemento. Ao serem ativadas expressam moléculas de adesão e produzem citocinas e quimiocinas, fatores de crescimento, substâncias vasoativas, moléculas do complexo principal de histocompatibilidade, fatores pró-coagulantes e anticoagulantes e outros produtos biologicamente ativos (**Figura 7**).

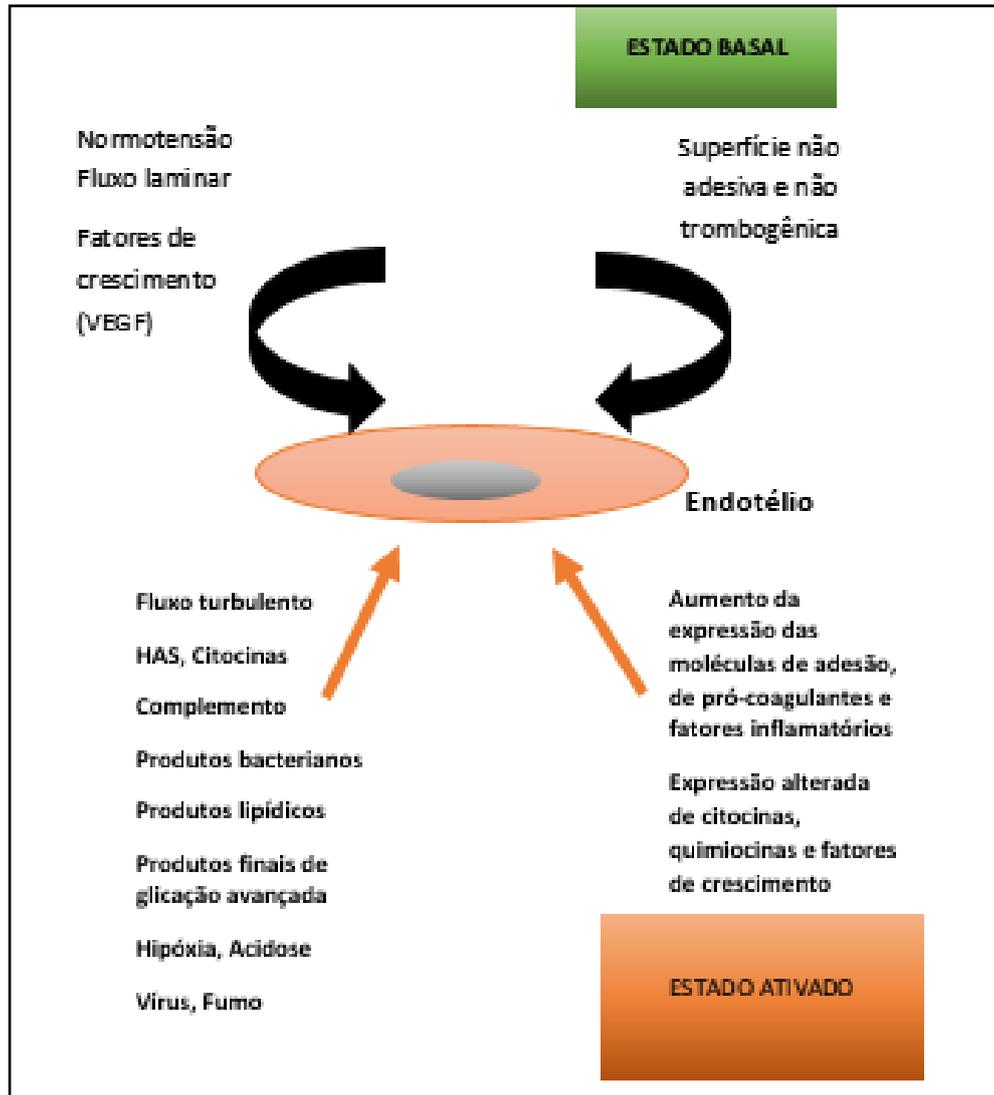


Figura 7 - Representação gráfica do papel do endotélio em estado quiescente ou basal e estado ativado.

Fonte: Kumar Abbas e Fausto Michell. ⁽⁵²⁾

Lesão na parede dos vasos resulta em respostas proliferativas que envolvem as células musculares lisas, a deposição da matriz extracelular e a expansão da íntima. O recrutamento e ativação de células musculares lisas envolvem sinais provenientes das células endoteliais, plaquetas, macrófagos além de mediadores da cascata da coagulação e do complemento. O espessamento acentuado da íntima pode resultar em estenose e obstrução vascular. Estas alterações são observadas na AF, caracterizando a vasculopatia que ao longo do tempo desenvolvem dano orgânico irreversível.

3.8 Hemólise e Vasculopatia

Os eritrócitos falciformes sofrem alterações na membrana, que acaba por se romper, levando a hemólise intravascular e anemia hemolítica crônica de diversos graus de magnitude.⁽⁵³⁾

Um terço da hemólise é intravascular e 2/3 é extravascular por fagocitose. A hemólise intravascular é hoje reconhecida como um dos fatores centrais da fisiopatogenia da DF, envolvendo inativação e diminuição da produção do óxido nítrico. Durante a hemólise intravascular hemoglobina livre e arginase são liberados. A arginase utiliza o substrato arginina, para a produção de ornitina, poliaminas e prolina, responsáveis pela proliferação da camada muscular lisa e síntese de colágeno da parede do vaso, resultando em estenose vascular e vasculopatia. A arginina é o precursor normal da produção de NO que em presença da NO endotelial sintetase é convertida em citrulina e a seguir em NO. A hemoglobina livre consome NO, produzindo metemoglobina e nitratos inativos. A depleção do substrato arginina e o sequestro de NO causam redução local desta substância e vasoconstrição. O estado de vasoconstrição retarda o fluxo sanguíneo e retroalimenta a polimerização das hemácias falciformes. A superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o superóxido, por via enzimática (xantina oxidase, NADPH oxidase, eNOS desacoplado) e não enzimática promove estresse oxidativo intravascular que pode também perturbar a homeostase do NO.⁽⁵⁴⁾

O óxido nítrico, além do efeito vasodilatador, inibe a agregação de plaquetas, diminui a expressão das moléculas de adesão, inibe a formação de trombina, inibe a proliferação da íntima do endotélio evitando estenose e obstrução vascular.⁽⁵⁵⁾

3.9 O Estresse oxidativo na Anemia Falciforme

Durante o metabolismo humano normal, reações fisiológicas produzem espécies reativas derivadas do oxigênio (EROS) e do nitrogênio (ERN) que são rapidamente neutralizadas por enzimas antioxidantes, sem prejuízo a integridade celular. Estas substâncias são moléculas instáveis que tendem a se associar de maneira rápida a outras moléculas de carga positiva como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos produzindo reações e oxidação. O dano causado pelos radicais livres pode alterar a membrana de células como os eritrócitos,

desregulando o transporte intermembrana^(56, 57). Neutrófilos e macrófagos ativados na resposta inflamatória e lesões de isquemia reperfusão produzem grandes quantidades de radicais livres.

Existem muitas causas de estresse oxidativo na DF. A hemólise ao liberar hemoglobina livre e arginase contribuem para a deficiência de óxido nítrico, um importante antioxidante endógeno; o heme livre liberado durante a hemólise é oxidativo; o ferro elementar liberado pelo turnover do heme pode gerar peróxido de hidrogênio^(58,59). Enzimas excessivamente ativadas na AF geram radicais de oxigênio como um subproduto de suas atividades enzimáticas, xantina oxidoreductase (XOR) e NADPH oxidase. Na AF existe um predomínio da endotelina-1, um potente vasoconstrictor, com ação pró-inflamatória, em detrimento a produção biológica de NO⁽²³⁾ e resistência a NO⁽⁶⁰⁾ que apresenta ação antiinflamatória e antioxidante.

Lesões de isquemia- reperfusão aumentam o cálcio no interior das células lesando irreversivelmente as mitocôndrias. Induzem adesão de plaquetas e leucócitos ao endotélio.⁽⁶¹⁾ O influxo de leucócitos e as células endoteliais geram radicais livres e citocinas produzindo mais dano celular.

3.10 Metabolismo Lipídico

Os lipídeos, por serem substâncias insolúveis circulam no plasma em associação com complexos lipoprotéicos. Há cinco classes de lipoproteínas, separadas de acordo com sua densidade e mobilidade eletroforética: quilomícrons, lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de densidade baixa (LDL), lipoproteínas de densidade alta (HDL).^(62,63) O fígado tem papel central na regulação da síntese, degradação e armazenamento de lípidos e lipoproteínas.^(62- 64)

As lipoproteínas apresentam em sua superfície fosfolípidos, colesterol livre e apoproteínas. No núcleo, triglicerídeos (TG) e ésteres do colesterol.⁽⁶⁵⁾ **(Figura 8)**

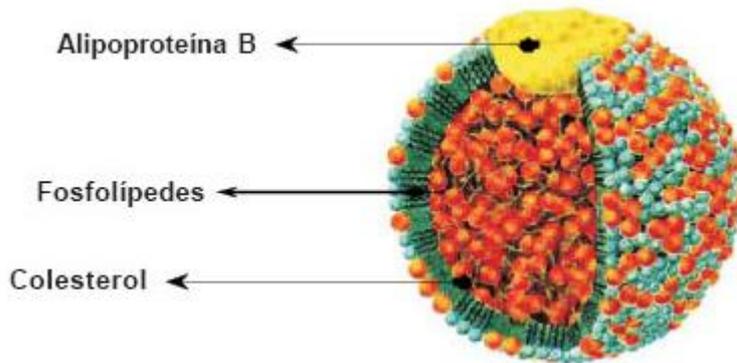


Figura 8 - Desenho da estrutura da lipoproteína de baixa densidade

Fonte: Naoum 2005 ⁽³¹⁾

As apolipoproteínas ligam o colesterol e triglicérides a receptores específicos na superfície celular direcionando-os para os órgãos-alvo e tecidos do organismo. Participam da ativação ou inibição de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico. A apolipoproteína A-I (apo A-I) é o maior componente do HDL.⁽⁶⁶⁾ Atua como cofator para a enzima lecitina colesterol acetil transferase (LCAT) e mediador na transferência do colesterol das células para as partículas de HDL que farão o transporte do colesterol para o fígado, onde será metabolizado ou excretado sob forma de sais biliares (transporte reverso do colesterol).⁽⁶⁶⁾ A apolipoproteína B (apo B) está presente nos quilomícrons, VLDL, IDL, e LDL⁽⁶⁷⁾ e faz o transporte de colesterol para as células periféricas. Cerca de 90% da proteína na LDL se constitui de apo B ⁽⁶⁸⁾. Na corrente sanguínea a enzima lipase proteica (LPL) localizada na superfície luminal das células endoteliais, hidrolisa o TG transportado pelos quilomícrons e VLDL. LDL são as lipoproteínas com maior conteúdo de colesterol. Transferem o colesterol para as células através de receptores específicos localizados na membrana celular, que reconhecem a apo-B. Estes receptores estão presentes nos tecidos onde o colesterol é mais requisitado, como o tecido hematopoiético.⁽⁶⁴⁾ O principal papel do colesterol é na síntese da membrana plasmática. **(Figura 9)**

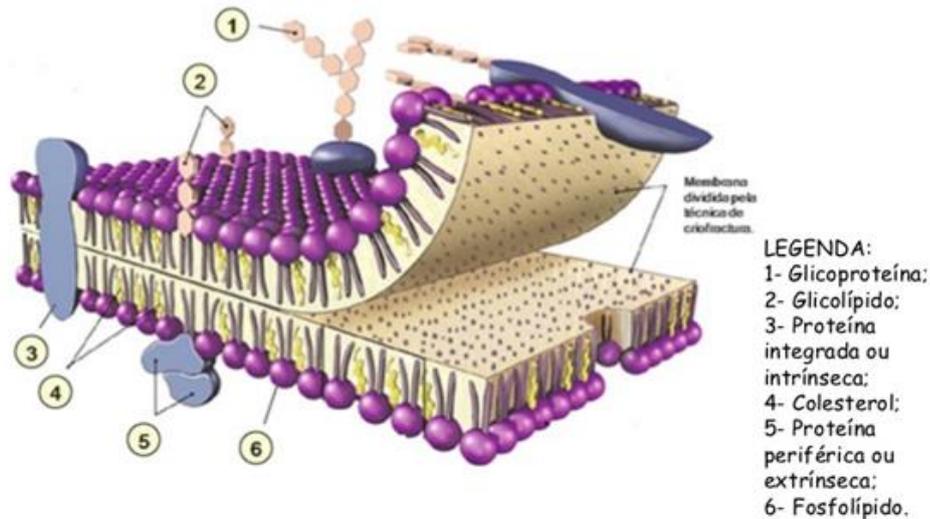


Figura 9 - Esquema da estrutura da membrana plasmática

Constituição da membrana plasmática: 52% de proteínas, 40% de lipídios (fosfolípidos e colesterol) e 8% de carboidrato.⁽³¹⁾

Fonte: Teixeira slideshare.⁽⁶⁹⁾ <https://pt.slideshare.net/margaridabt/membrana-plasmatica-7205208>

3.11 Metabolismo lipídico na Anemia falciforme

Hipocolesterolemia é considerada quando os valores do colesterol estão abaixo de 120mg/dl.⁽⁷⁰⁾ Segundo Yesim Oztas é uma condição frequentemente negligenciada, mas que está associada a risco de morte em doenças hepáticas e em doenças catabólicas, como câncer. Reserva antioxidante diminuída e consequente estresse oxidativo é um dos principais mecanismos relacionados a hipocolesterolemia.⁽⁷¹⁾

Baixos níveis de colesterol têm sido relacionado a vários tipos de anemia, como anemia megaloblástica, anemia ferropriva, talassemia, esferocitose congênita e anemia falciforme.⁽³¹⁾ Algumas hipóteses foram levantadas para explicar este fenômeno: a) maior utilização do colesterol para produção de eritrócitos em situações de menor sobrevivência da hemácia ou hematopoese aumentada, b) diluição do colesterol sérico em função da diluição do plasma em decorrência da diminuição da massa eritrocitária, c) lesões hepáticas, d) ativação do sistema retículo endotelial, e) maior oxidação do LDL-C por maior exposição a radicais livres.

Estudos realizados em adultos e crianças com AF demonstraram níveis diminuídos de CT, LDL-C, HDL-C e aumento de TG.⁽²⁵⁻²⁷⁾ A hematopoiese aumentada em virtude da hemólise crônica, consome o colesterol para síntese da membrana celular do eritrócito. Em indivíduos com α -talassemia, a análise de apolipoproteínas demonstrou diminuição de apo A-1 e de apo B e aumento do conteúdo de triglicérides em todas as lipoproteínas.⁽⁷²⁾

Na AF as alterações na função hepática, muito frequentes nesta condição, levam a diminuição da produção do colesterol e aumento da síntese de triglicérides. O aumento do catabolismo induzido pela anemia crônica, aumenta a liberação de ácidos graxos livres, maior oferta dessas substâncias ao fígado, contribuindo também para maior produção de triglicérides. Algumas condições propiciadoras de estresse oxidativo como: aumento do oxigênio livre não utilizado pela hemácia em foice, gerando radicais superóxidos (H_2O_2), aumento do ferro livre proveniente das transfusões sanguíneas e hemólise crônica, levando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as lesões de isquemia-reperfusão, favorecendo a inflamação e produção de radicais livres, contribuem para oxidação do LDL-C e aumento da sua depuração pelo sistema retículo endotelial. Diminuição do conteúdo de vitamina E, potente antioxidante das lipoproteínas de pacientes falciformes é fator que desbalança a oxidação destas lipoproteínas.^(73,74) A deficiência de NO em consequência da hemólise também interfere no metabolismo lipídico na AF.

Hipocolesterolemia e níveis diminuídos de LDL tem sido descrito em doenças que cursam com hiperproliferação celular ^(75,76), como algumas neoplasias e doenças mieloproliferativas, em virtude de maior expressão de receptores do LDL nestas células para utilização do colesterol na formação da membrana plasmática celular. Este é um mecanismo que pode estar presente na AF.

Segundo Naoum,⁽³¹⁾ estudar o metabolismo lipídico na AF, trará compreensão sobre os vários caminhos biológicos, ainda pouco explorados, que envolvem este mecanismo na complexa fisiopatologia da AF.

3.12 Citocinas

Citocinas são um grupo de proteínas responsáveis por emissão de sinais entre as células envolvidas na resposta inflamatória. São produzidas por vários tipos de células principalmente linfócitos, macrófagos ativados, células dendríticas, células

endoteliais, epiteliais e tecido conjuntivo. Podem agir nas próprias células que as produzem, em células vizinhas e mais raramente a distância. Abrangem várias categorias: interferons (INF), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF) e fator de transformação de crescimento (TGF β).⁽⁷⁷⁾

As interleucinas compõem um grande número de moléculas produzidas principalmente pelos linfócitos T. Existem mais de 36 tipos de interleucinas, algumas com alguns subtipos como IL-1b, IL-1 α , de acordo com sua atividade. De uma forma geral são capazes de promover o crescimento celular, diferenciação e ativação funcional. Atuam em grupos específicos de células que expressam receptores adequados para cada uma delas, mas podem ter atividades superponíveis.⁽⁷⁸⁾ (Figura 10)

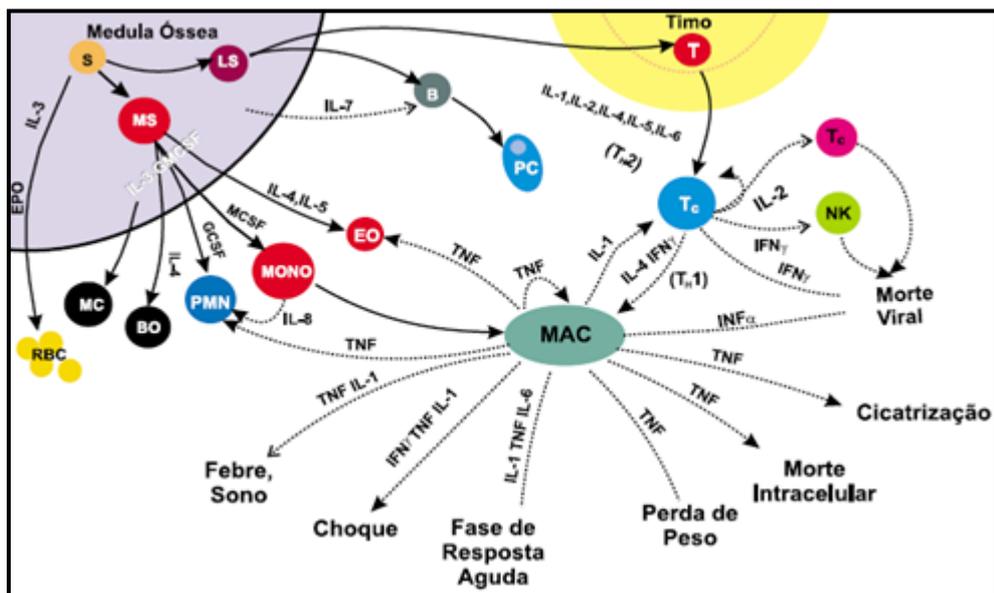


Figura 10 - Produção e interações das citocinas

S: célula tronco; LS: célula tronco linfóide; MS: célula tronco mieloide; MAC: macrófago; MC: mastócito; PMN: polimorfonucleares; BO: basófilo; EO: eosinófilo; PC: plasmócito; Tc: linfócito T citotóxico; IL: interleucinas; TNF: fator de necrose tumoral; MCSF: fator de estímulo de colônias de granulócitos; EPO: eritropoetina; Tn: linfócito T auxiliar; RGC: eritrócito.

Fonte: Naoum PC, 2001 ⁽⁷⁷⁾

3.12.1 Citocinas avaliadas neste estudo: produção, células alvo e ações ^(78,79)

- IL-1: secretada pelos macrófagos, monócitos e linfócitos B participa na regulação de respostas imunes, reações inflamatórias e hematopoiese. Induz expressão de selectina E, VCAM-1, ICAM-1 pelo endotélio. Aumenta produção de Proteína C-reativa e amiloide sérico.
- IL-6: secretada pelos linfócitos T e B, endotélio, fibroblastos e macrófagos, estimula o fígado na produção de proteínas da fase aguda como PCR e amiloide P sérico. Induz a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, linfócitos. Induz a hematopoiese.
- IL-8: sintetizada por macrófago; quimiotáticas para neutrófilos e linfócitos T. Estimula a inflamação. Aumenta a expressão de moléculas de adesão (V-CAM e I-CAM)
- IL-10: inibe a produção de citocinas Th1 e macrófagos, inibe a produção de interferon-gama (IFN- γ), IL-1, IL-6, IL-10 e TNF-alfa e suspende a apresentação de antígenos. Por outro lado, ativa linfócitos B. Desse modo inibe a resposta de combate contra patógenos intracelulares e tumores e estimula resposta contra patógenos extracelulares. Inibe a formação de granulócitos.
- IL-12: sintetizada por linfócitos B e macrófagos estimula os Linfócito NK e T a produzirem IFN- γ e respostas Th1. Se opõe aos efeitos de IL-10.
- IL-17: indução da produção de citocinas pró-inflamatórias, em especial IL-8
- TNF- α (fator de necrose tumoral): É produzido principalmente pelos macrófagos. Inibem o crescimento de células tumorais, estimulam a resposta inflamatória e outras citocinas que causam febre e combatem infecções.

3.13 Citocinas na Anemia Falciforme

Anemia Falciforme é caracterizada por estado inflamatório crônico que contribue para diminuir a sobrevida e comprometer a qualidade de vida.⁸⁰ Vasoclusões recorrentes, hemólise e ativação endotelial induzem resposta inflamatória contínua que se manifestam com aumento dos níveis de citocinas, diminuição da biodisponibilidade do NO e estresse oxidativo.⁸⁰ Hemólise intravascular libera hemoglobina livre para o plasma, heme e espécies reativas de oxigênio que contribuem para a ativação de glóbulos vermelhos, leucócitos,

plaquetas e células endoteliais. Esta ativação leva ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, que dão a AF as características de doença inflamatória crônica^(14,79,81). Citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-17^(17,82) tem um importante papel na resposta inflamatória na AF. Estudos indicam que TNF- α é o principal mediador da resposta inflamatória aguda, recrutando neutrófilos e monócitos para o sítio da inflamação. Elevação dos níveis de TNF- α estimulam a produção de IL-6, que por sua vez estimulam a produção de proteínas da fase aguda da inflamação. A IL-17 ativa células endoteliais e macrófagos a produzirem mais IL-6 e TNF- α .⁽⁸³⁾ IL-1 β também está associada a ativação de leucócitos, particularmente monócitos e neutrófilos. Qari et al. (2012)⁽⁸³⁾ observou concentrações plasmáticas elevadas de IL-1 β em pacientes com AF quando comparados a controles e níveis mais altos desta citocina durante o estado estacionário do que durante episódios dolorosos. Em 2011, Asare et al.⁽⁸⁴⁾ demonstraram que níveis elevados de IL-1 β no plasma é um bom preditor de AVC, protegendo pacientes jovens com AF contra desenvolvimento desta complicação.

Estudos tem demonstrado níveis elevados de citocinas em estado estável da doença.^(85,86) Acredita-se que oclusão microvascular subclínica importante ocorra na AF. Adesão das hemácias em foice na parede do vaso durante estas vasoclusões subclínicas, inflamação e tensões de cisalhamento produzem dano, ativação endotelial e elevação de citocinas^(80,87). As citocinas e quimiocinas produzidas pelo endotélio ativado contribuem, por sua vez, para a ativação pan-celular mais produção de TNF- α , IL-6, e IL-17, produzindo um círculo vicioso que leva à perpetuação da inflamação crônica.

Além de produzir NO, as células endoteliais liberam endotelina-1, um peptídeo pró-inflamatório e potente vasoconstritor de grandes e pequenas artérias e veias. Durante quadros inflamatórios agudos, como síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA), coagulação intravascular disseminada e sepse, os níveis plasmáticos de endotelina-1 estão elevados, assim como nos pacientes com doença falciforme. Esse peptídeo aumenta as concentrações de **VCAM-1 e ICAM-1** solúveis e também estimula monócitos a secretarem citocinas inflamatórias, como **IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , GC-SF** e substâncias que aumentam a produção de superóxidos pelos neutrófilos.

Estudos que avaliam interleucinas na AF tem demonstrado resultados não uniformes quanto a interleucinas que predominam em estado estável e crise

vasoclusiva e poucos estudos tem avaliado correlações de interleucinas com marcadores clínicos e laboratoriais da doença. **(Tabela 3)**

3.13.1 Trabalhos sobre citocinas na Anemia Falciforme

Tabela 1 - Trabalhos sobre Citocinas na Anemia Falciforme

Autor e col./ Ano	Interleucinas	Resultado
Francis (1992) ⁽¹⁷⁾	TNF α , IL-1	TNF- α foi elevada em 18 dos 21 indivíduos no estado estacionário e 13 dos 19 indivíduos em CVO. IL-1 foi elevada em 6 indivíduos em estado estacionário e 3 indivíduos em crise.
Croziat (1994) ⁽⁸⁵⁾	GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-1 α , IL-1 β	HbF <9% se associou a GM-CSF \uparrow ; observado baixos níveis de IL-3, IL-1 e IL-6 sem correlação com HbF.
Taylor (1997) ⁽⁸⁸⁾	IL-4, IL-6 e IL-10	Aumento significativo das IL-4 e IL-6 e elevação de IL-10 no grupo AF (aumento de cytokine Th2).
Kubividia(1997) ⁽⁸⁹⁾	TNF α	Crianças com AF em estado estável apresentam níveis de TNF α menor que aquelas com déficit de crescimento
Graido-Gonzalez(1998) ⁽⁹⁰⁾	TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, Endotelina e PGE2	TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10, endotelina e PGE2 não foram elevados na AF assintomática quando comparado a controles saudáveis. Endotelina e PGE2 foram elevadas durante CVO.
Bourantas (1998) ⁽⁸⁶⁾	IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , PCR, ceruloplasmina, transferrina	IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , não foi detectada em pacientes com AF. IL-6 foi significativamente elevada e pode ser responsável pelos níveis elevados de PCR durante o estado estável da doença.
Gonçalves (2001) ⁽⁹¹⁾	IL-8 (1 a 45 anos de idade) CVO vs estado estável	IL-8 foi mais elevada durante CVO vs estado estável e semelhante entre estado estável e controles

Tabela 1 - Trabalhos sobre Citocinas na Anemia Falciforme (Continuação)

Autor e col./ Ano	Interleucinas	Resultado
Pathare (2004) ¹⁸	IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ	Na CVO houve níveis elevados de TNF- α (p <0,092) e IL-6 (P <0,024) quando comparados com o estado estacionário. No estado estável TNF- α foi semelhante aos controles. No estado estável IL-1 β (p <0,04), IL-6 (p <0,0001) e IFN- γ (p <0,02) foram mais elevadas quando comparado a indivíduos normais.
Vicari (2007) ⁹²	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 107 pacientes	TNF- α , IL-1 β , IL-6 foram semelhantes em pacientes e controles. IL-8 foi mais elevada em falcêmicos que controles. IL-8, aumento da idade, Hb baixa e níveis de LDH elevado foram significativamente elevados em pacientes com hipertensão pulmonar (HP), podendo representar fator de risco para HP.
Akohoue (2007) ⁹³	IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-10 e TNF α , PCR e F2-IsoPM para estresse oxidativo. Gasto energético, inflamação e estresse oxidativo na AF, faixa etária de 9 a 15 anos de idade em estado estável	IL-8, leucócitos, PCR e estresse oxidativo estão elevados no grupo AF e foram fatores independentes para aumento do gasto energético em crianças de 9 a 15 anos de idade.
Lanaro (2009) ⁹⁴	TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , HO-1 (heme oxigenase 1), cyclooxygenase 2 (COX-2) e indutível NOS (iNOS), PGE2	IL-8, TNF- α , COX-2 e PGE2 foram mais elevados no grupo AF. IL-10 foi semelhante entre AF e controles. No grupo tratado com HU houve redução significativa de TNF- α .
Asare (2010) ⁸⁴	IL- 1 β	Concentração moderada de IL-1 β plasmática está associada a diminuição da probabilidade de AVC na AF
Bandeira (2014) ⁹⁵	IL-6, TNF- α , IL-17	TNF- α (p=0,025) e IL-6 (p=0,003), estão elevadas no estado estável quando comparado a controles. IL-6, TNF- α foram mais elevadas em indivíduos com haplótipo Bantu-Bantu que Benin-Benin e Bantu-Benin

Tabela 1 - Trabalhos sobre Citocinas na Anemia Falciforme (Continuação)

Autor e col./ Ano	Interleucinas	Resultado
Da Silva (2014) ⁹⁶	IL-6, IL-17A, IL-22, IL-23 (Th17)e cultura de células mononucleares	Em pacientes com úlcera de perna apresentaram IL-6, IL-17 A, IL-22 associadas a níveis elevados de LDH. Nestes pacientes elevação de IL-17A produziu proteção para STA
Nnodim Johnkennedy ⁽⁹⁷⁾ (2015)	IL- 1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , IFN- γ Estado estável vs CVO	TNF- α e IL-6 foram elevadas na CVO vs estado estável. IL-1 β , IL-6 e IFN- γ foram elevadas em pacientes com AF estáveis versus controles
Sarray (2015) ⁽⁹⁸⁾	IL-6, IL-10 e TNF- α Estado estável vs CVO Crianças com AF	IL-10 foi mais elevada no estado estável; IL-6 e TNF- α durante CVO. IL-10 apresentou correlação negativa com a frequência, tipo, gravidade e duração do COV e com necessidade de tratamento com hidroxiureia, enquanto a IL-6 se correlacionou positivamente com a duração dos episódios de COV.
Vilas-Boas (2016) ⁹⁹	IL-17, TGF- β ,homocisteína (Hcy), sVCAM	IL-17 foi significativamente mais elevada em indivíduos com AF. Houve associação significativa entre Hcy, IL-17, TGF- β , sVCAM, sugerindo que estas moléculas contribuem para a inflamação e ativação vascular na AF.

3.14 Vasoclusão

A interação da hemácia em foice com o endotélio vascular é o gatilho para a ativação desta estrutura e desencadeamento de vários fenômenos que culminam em vasoclusão, isquemia, estresse oxidativo, inflamação e vasculopatia a longo prazo.⁽¹⁰⁰⁾ A oclusão microvascular resulta em crises dolorosas agudas, enquanto a oclusão macrovascular parece ser a causa da falência de órgãos.⁽¹⁰¹⁾

A aderência aumentada dos eritrócitos falciformes ao endotélio tem sido implicada como o passo inicial da vasoclusão.⁽¹⁰⁰⁾ Ativação endotelial e expressão de moléculas de adesão demonstraram que a adesão participa ativamente da

obstrução vascular e desencadeamento de fenômenos inflamatórios.⁽⁸⁰⁾ Outros pesquisadores têm destacado a interferência dos leucócitos e das plaquetas. Leucócitos aderidos, agregando-se a plaquetas, obstruem o lúmen, estimulam o endotélio vascular aumentar a expressão de ligandos para moléculas de adesão a parede do vaso (VCAM-1), adesão intercelular (ICAM), adesão entre plaquetas (P-selectina) e adesão de plaquetas ao endotélio (E-selectina), causando danos aos tecidos e reação inflamatória que predispõe a vaso-oclusão.⁽⁶¹⁾

O endotélio lesado expõe fator tecidual, desencadeia a cascata da coagulação e libera multímeros de Von Willebrand, num complexo processo de retroalimentação da vasocclusão. **(Figura 11)**

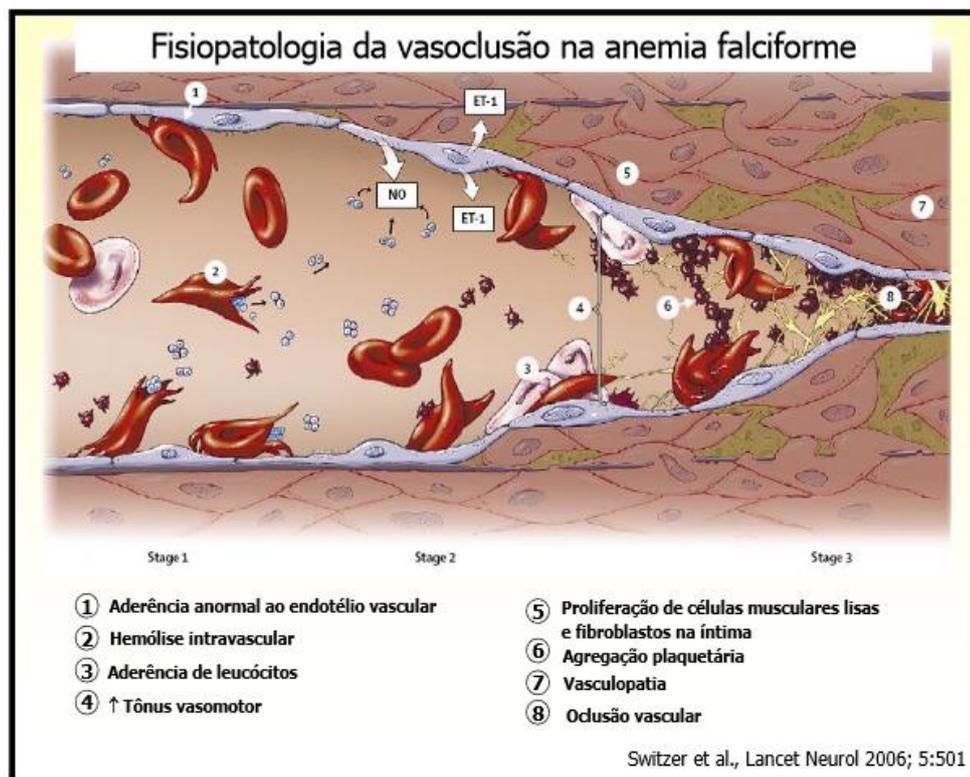
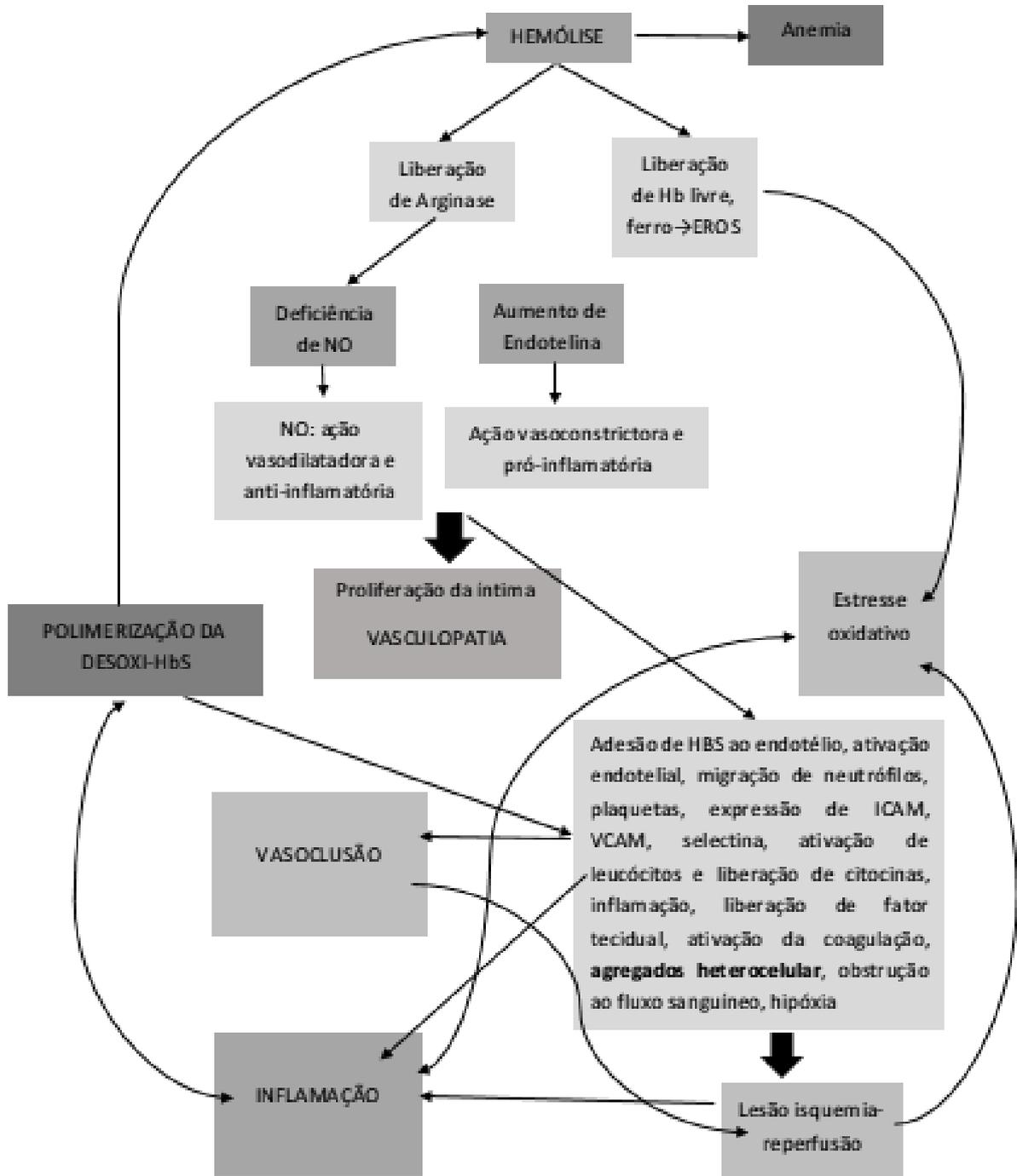


Figura 11 - Representação da fisiopatologia da vasocclusão

Fonte: Switzer 2006⁽¹⁰²⁾

3.15 Resumo da Fisiopatologia da Anemia Falciforme em forma de Algoritmo



Fonte: Autoria própria

3.16 Manifestações Clínicas da Anemia Falciforme

A AF apresenta natureza pleiotrópica, ou seja, uma mutação em ponto único, determina múltiplas expressões fenotípicas associadas a interações genéticas complexas e modificadoras que não são bem compreendidos.^(103,104) As complicações desta doença são numerosas e afetam todos os órgãos e / ou tecidos do corpo, podendo se apresentar com manifestações agudas ou crônicas. Abaixo estão relacionadas as principais complicações observadas na AF.⁽¹⁰⁵⁾

Exacerbações Agudas de Anemia

Sequestro Esplênico Agudo

Episódio Aplásico

Hiperhemólise

Complicações Cardíacas

Cardiomegalia

Cardiomiopatia

Insuficiência Cardíaca Congestiva

Hipertensão

Prolapso da Valva Mitral

Enfarte do Miocárdio

Distúrbios do Crescimento e Desenvolvimento

Retardo de crescimento (baixa estatura, falha no crescimento)

Complicações Gastrointestinais / Hepatobiliares

Colecistite

Colelitíase / Lama Biliar

Sequestro hepático

Colestase Intra-hepática

Pancreatite

Hepatite Viral

Complicações Musculares / Esqueléticas / Pele

Necrose Avascular (AVN)

Dactilite (síndrome mão-pé)

Úlceras da perna

Miosite / Mionecrose / Fasciite

Osteomielite (aguda ou recorrente)

Osteopenia / Osteoporose

Complicações Neurológicas (Sistema Nervoso Central)

AVC - aneurisma

Acidente Vascular Cerebral - Hemorrágico

Acidente vascular cerebral - infarto

Derrame - Moya Moya

Acidente Vascular Cerebral - Infarto Cerebral Silencioso

Ataque Isquêmico Transitório

Complicações Oftalmológicas

Estrias Angióides

Lesão Black Sunburst

Sinal de vírgula conjuntival

Glaucoma (secundário à presença de sangue na câmara anterior do olho)

Hifema

Retinopatia Proliferativa

Descolamento de Retina

Hemorragia em Patch de Salmão

Hemorragia Vítrea

Síndromes de Dor

Episódio Agudo de dor

Síndromes da dor iatrogênica

Neuropatia (dor neuropática)

Complicações pulmonares

Síndrome Torácica Aguda (STA)

Asma

Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

Doença Pulmonar Restritiva Crônica

Embolia Pulmonar

Hipertensão Pulmonar

Complicações Renais / Geniturinárias

Insuficiência Renal Aguda

Insuficiência Renal Crônica

Hematúria

Priapismo

Proteinúria / Síndrome Nefrótica

Pielonefrite

Complicações Esplênicas

Infarto Esplênico Agudo

Asplenia Funcional

Hipersplenismo

Sequestro Esplênico Agudo

Complicações secundárias a transfusões e sobrecarga de ferro

Síndrome de Hiperviscosidade

Hemólise Imune

Hemossiderose transfusional

3.17 Fatores de risco para eventos adversos na Anemia falciforme

Esforços tem sido realizado para identificar preditores de gravidade na Doença Falciforme a fim de que terapias mais efetivas, porém com potencialidade para complicações, sejam selecionadas e instituídas precocemente.

Miller e col.⁽¹⁹⁾ acompanharam durante 10 anos 392 crianças portadoras de HbSS e S β talassemia, a partir de 6 meses de idade, observando **dactilite**, nível de **hemoglobina menor que 7 g/dl** no estado estável, **leucocitose** na ausência de infecção, como preditores de AVE, CVO frequentes, STA recorrentes e morte. Neste estudo **reticulócitos** acima da média $9,3 \pm 6\%$ esteve associado a doença mais severa ($p=0,001$). Estudos observaram que níveis baixos de hemoglobina se associam a risco de morte na infância⁽¹⁰⁶⁾, na vida adulta⁽⁷⁾ e risco de AVE ⁽¹⁰⁷⁾ enquanto níveis mais elevados de hemoglobina se correlacionam com aumento do risco de síndrome torácica aguda⁽¹⁰⁸⁾ e crise dolorosa.⁽¹⁰⁹⁾ **Leucocitose** foi associada a risco de acidente vascular cerebral em uma coorte de 310 crianças com HbSS, acompanhadas do nascimento até 14 anos de idade. A incidência de AVE nesta coorte foi de 7,8%.⁽²⁰⁾ A redução acelerada do nível de hemoglobina fetal durante a infância tem sido associada à perda da função esplênica ⁽¹¹⁰⁾ e a ocorrência desse

evento antes de um ano de idade pode estar fortemente associada a risco de doença grave. Em 1994, o Cooperative Study of Sickle Cell Disease (CSSCD)⁽¹¹¹⁾ observou que indivíduos com Doença Falciforme com valores de **Hb fetal (HbF)** maior que 8% sobreviviam mais do que aqueles com valor abaixo desse ponto de corte.

A dilatação mediada por fluxo da artéria braquial, avaliada por método ultrassonográfico com Doppler quando abaixo de 6,65% apresentou sensibilidade de 55% e especificidade de 79% para risco de Síndrome torácica aguda, em estudo realizado com portadores de HbSS de 6 a 18 anos de idade.⁽¹¹²⁾

Contagem leucocitária elevada no paciente sem crise é fator independente de risco para morte precoce e está associada a várias complicações como: AVC, infarto cerebral silencioso, síndrome torácica aguda e priapismo.^(21, 113) Também está significativamente associada ao desenvolvimento de nefropatia⁽⁶¹⁾ da AF.

Em crianças com HbSS **níveis elevados de desidrogenase láctica** se correlacionaram significativamente com hemoglobina, reticulócitos, aspartato transaminase e alterações no fluxo sanguíneo da artéria cerebral média avaliadas através do doppler transcraniano.⁽¹¹⁴⁾

Elevação dos níveis séricos de desidrogenase láctica, elevação de bilirrubina e diminuição da Hb se relacionaram a maior prevalência e maior severidade de hipertensão pulmonar.⁽¹¹⁵⁾ **Episódios recorrentes de dor associam-se** à mortalidade precoce em maiores de 20 anos de idade.⁽¹⁰⁹⁾ Os episódios de dor aguda tendem a ser mais frequentes em pacientes com HbSS, hematócrito alto, baixa concentração de hemoglobina fetal⁽¹⁰⁹⁾, história de sibilância por asma ⁽¹¹⁶⁾ e hipoxemia noturna.⁽¹¹⁷⁾ Estas informações foram importantes para definir os critérios de inclusão para tratamento com Hidroxiuréia.

Alguns estudos têm demonstrado que na AF, a diminuição do NO parece ter papel preponderante na propensão ao desenvolvimento de AVC, hipertensão pulmonar, úlceras de membros inferiores e priapismo.⁽²⁴⁾

Zorca e col. ⁽¹¹⁸⁾ avaliando 328 indivíduos com HbSS e S β talassemia quanto ao perfil lipídico e sua associação com hemólise, disfunção endotelial e hipertensão pulmonar observaram que triglicérides foi fator independente para aumento da velocidade de regurgitação na válvula tricúspide ($p=0.002$) e TG/HDL-C apresentou correlação significativa com disfunção endotelial, através do fluxo sanguíneo na artéria braquial ($p<0,005$).

Quadro 3 - Fatores de risco para eventos adversos na Anemia Falciforme

Fatores de risco	Eventos Adversos
Dactilite em menores de 1 ano de idade	Morte precoce; AVE; CVO frequente; STA recorrente
Hemoglobina abaixo de 7g/dL no estado estável	Morte precoce; AVE; CVO frequente; STA recorrente
Hemoglobina elevada	STA e CVO
Leucócitos acima de $20 \times 10^9/L$ no steady state	Morte precoce na infância e na vida adulta; AVE; infarto silencioso; CVO frequente; STA recorrente; priapismo; nefropatia
Reticulócitos elevados	Doença mais severa
Hemoglobina Fetal abaixo de 8%	Menor sobrevida
Redução acelerada da Hemoglobina fetal no primeiro ano de vida	Doença mais severa
Desidrogenase láctica elevada no steady state	Hipertensão pulmonar; alterações no Doppler transcraniano
Crises vaso-oclusivas recorrentes	Morte precoce em menores de 20 anos de idade
Diminuição do óxido nítrico	AVC, hipertensão pulmonar, úlceras de membros inferiores e priapismo.
Triglicérides elevada	Aumento da velocidade de regurgitação na válvula tricúspide.
Vasodilatação mediada por fluxo abaixo de 6,65%	Risco de STA (OR: 1,45)

3.18 A Hidroxicarbamida

A Hidroxicarbamida(HDX) foi sintetizada pela primeira vez na Alemanha, por Dressler e Stein, em 1869.⁽¹¹⁹⁾ Somente um século depois, mais especificamente em 1967, este medicamento foi aprovado pelo FDA norte-americano para tratamento de doenças neoplásicas e nos anos subsequentes, para o tratamento de pacientes com leucemia mieloide crônica, psoríase e policitemia vera.⁽¹²⁰⁾ É uma droga citotóxica, anti-neoplásica e anti-metabólica, que promove bloqueio da síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA) pela inibição da enzima ribonucleotídeo redutase, mantendo as células em fase S do ciclo celular.⁽¹²¹⁾

A observação de que valores aumentados de hemoglobina fetal (Hb F) previnem várias complicações da DF conduziu os pesquisadores à busca por fármacos que aumentassem a síntese intraeritrocitária de Hb F.⁽¹²⁰⁾ A primeira aplicação clínica da HDX na AF foi em 1984. Em 1998 foi aprovado pelo FDA e em 2007 pela European Medicine Agency para uso na AF.

Foi observado que o uso da HDX aumenta o nível da hemoglobina, diminui a concentração de plaquetas e a contagem de células brancas, altera a expressão de moléculas de adesão e da produção do óxido nítrico.⁽¹²²⁾ Em um ensaio clínico randomizado a HDX diminuiu a frequência de episódios dolorosos, de síndrome torácica aguda, necessidade de transfusão sanguínea, e de internamento hospitalar em pacientes com anemia falciforme.⁽¹¹¹⁾ Além disso, aumenta as taxas de sobrevivência e a expectativa de vida, protege contra o desenvolvimento de doença cérebro-vascular, diminui dano orgânico ao longo do tempo.

Além da vantagem de administração oral, HDX é um medicamento seguro, de fácil controle; apresenta poucos efeitos adversos e o efeito mielossupressor facilmente detectável que produz é reversível após a suspensão do uso da mesma.

A HDX tem vários efeitos diretos no mecanismo fisiopatológico da DF. O aumento da síntese da Hb F reduz a polimerização da Hb S, inibe a externalização da fosfatidilserina na membrana do eritrócito falcizado diminuindo a sua remoção por macrófagos ativados, além de diminuir a adesão ao endotélio vascular e a ativação da coagulação. Promove diminuição do número dos neutrófilos, hidratação eritrocitária, redução da expressão de moléculas de adesão dos eritrócitos, aumento da síntese e biodisponibilidade de óxido nítrico pela ativação da guanidil ciclase e consequente aumento da GMP cíclico intraeritrocitária e endotelial. ^(122,123)

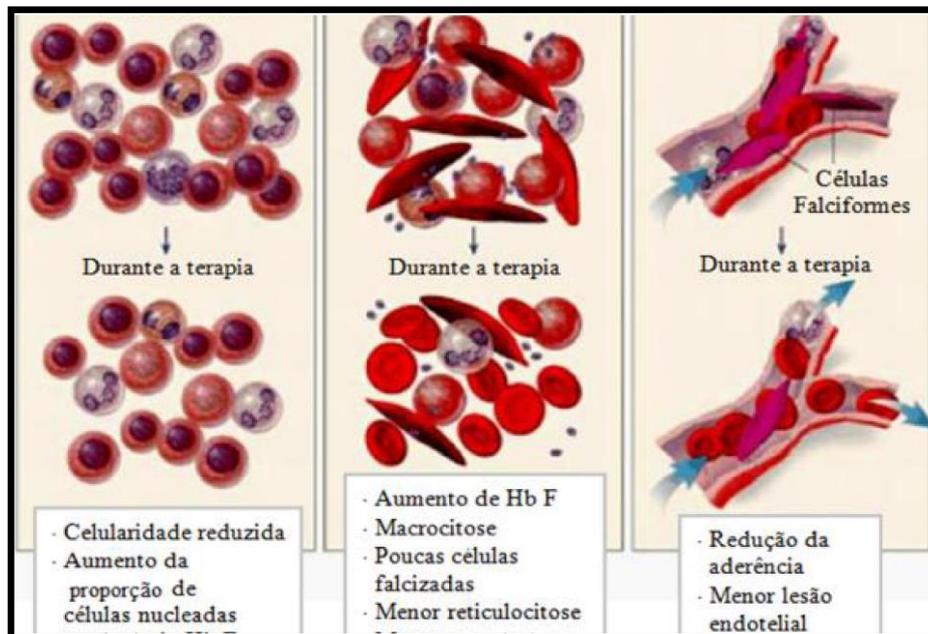


Figura 12 - Mecanismo de ação da Hidroxiuréia

Fonte: STEINBERG 1999 ⁽¹²⁴⁾

A PORTARIA CONJUNTA Nº 05, DE 19 DE FEVEREIRO DE 2018⁽¹²⁵⁾ aprovou o novo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme que normatiza as indicações e uso da HDX, prevenção de infecções com Fenoximetilpenicilina potássica (Penicilina V) ou penicilina benzatina e os critérios de inclusão para transplante alogênico aparentado mieloblástico de células-tronco hematopoiéticas (sangue de cordão umbilical, sangue periférico ou medula óssea). A terapêutica com HDX contempla crianças a partir de dois anos de idade. Inclui lactentes a partir de 9 meses de idade em situações especiais como: dactilite antes do primeiro ano de vida, concentração de Hb persistentemente menor que 7 g/dL (média de 3 dosagens fora de evento agudo), contagem de leucócitos maior que $20 \times 10^9/L$ (média de 3 dosagens fora de evento agudo), quando presente um destes achados, além dos critérios de inclusão previstos no protocolo.

A HDX administrada por via oral é rapidamente absorvida atingindo nível plasmático máximo entre 20-30 minutos. Tem meia vida plasmática de três a quatro horas, sendo metabolizada no fígado e excretada por via renal (80%).⁽¹²⁶⁾ Recomenda-se dose inicial de 15 mg/kg/dia, uma única vez ao dia, podendo ser aumentada até a dose máxima tolerada, que não deve exceder 35mg/kg/dia. É necessário controle de leucograma e plaquetas em virtude do potencial efeito

mielossupressor. Pode apresentar toxicidade para o fígado (elevação de 2 vezes no valor das transaminases), rins e aparelho gastrointestinal. Além disso, apresenta potencial carcinogênico e teratogênico.⁽¹²⁷⁾ Entretanto, estudos apontam que os benefícios do tratamento superam os riscos⁽⁷⁾, uma vez que o uso da HDX reduz em 40% o risco de óbito pela DF.⁽¹²⁸⁾

Critérios de inclusão para tratamento com HDX (Protocolo do MS 2018)⁽¹²⁵⁾

Ter apresentado pelo menos uma das complicações abaixo nos últimos 12 meses:

- Três ou mais episódios de crises vasclusivas com necessidade de atendimento médico
- Dois episódios de síndrome torácica aguda (definida como dor torácica aguda com infiltrado pulmonar novo, febre de 37,5°C ou superior, taquipneia, sibilos pulmonares ou tosse)
- Um episódio de priapismo grave ou priapismo recorrente
- Necrose isquêmica óssea
- Insuficiência renal
- Proteinúria de 24 h maior ou igual a 1 g
- Anemia grave e persistente (Hb menor que 6 g/dL em três dosagens no período de 3 meses)
- Desidrogenase láctica (DHL) elevada duas vezes acima do limite superior nas crianças ou adolescentes e acima de três vezes do limite superior no adulto
- Alterações no eco -Doppler transcraniano acima de 160 e até 200 cm/s;
- Retinopatia proliferativa
- Quaisquer outras situações em que haja comprovação de lesão crônica de órgão (s).

3.19 Avaliação da Função Endotelial

A função endotelial pode ser avaliada através de diferentes abordagens: (1) aferição de características mecânicas do vaso e da parede vascular (espessura das camadas íntima e média, complacência, distensibilidade e índices de remodelação);

(2) determinação de marcadores endoteliais solúveis como fator de Von Willebrand, ativador de plasminogênio, inibidor de moléculas de adesão, complexos trombomodulina e N-óxidos; (3) avaliação da regulação do tônus vascular endotélio-dependente.⁽¹²⁹⁾

Em 1992, foi descrito um teste não invasivo utilizando ultrassom para acessar a função vascular de uma artéria de condutância na circulação sistêmica.⁽¹³³⁾ Nesse método, o diâmetro da artéria braquial é medido antes e depois de um aumento do *shear stress*, induzido por hiperemia reativa (FMD). Quando um *cuff* de esfigmomanômetro colocado no antebraço é insuflado e liberado 4 a 5 minutos após, a velocidade mediada por fluxo (VMF) ocorre predominantemente como um resultado da liberação endotelial de NO.⁽¹³⁰⁾ **(Figura 13)**

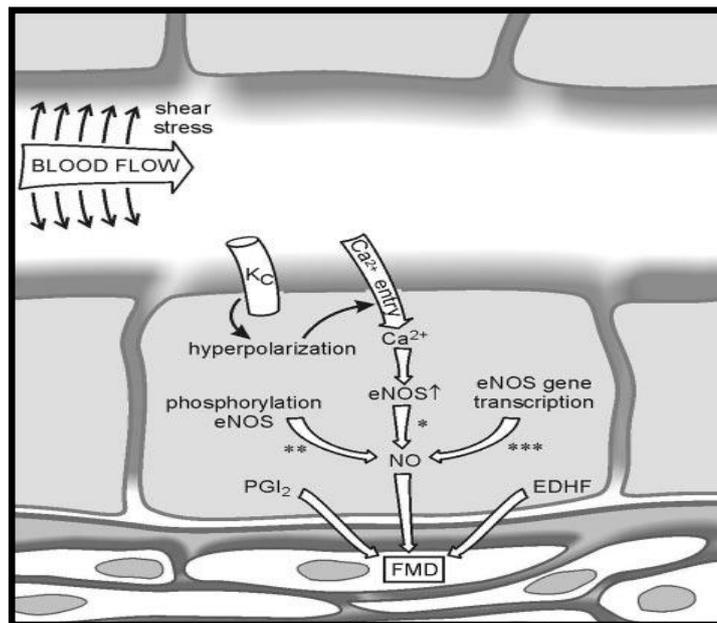


Figura 13 - Representação gráfica da gênese da vasodilatação mediada por fluxo

Gênese da Vasodilatação mediada por fluxo. Shear-stress (tensão de cisalhamento), eNOS (óxido nítrico sintetase endotelial), PG₂ (prostaciclina), EDHF (fator hiperpolarizante derivado do endotélio), Kc (canais de potássio e cálcio ativados), FMD (dilatação mediada por fluxo).

Fonte: Moens AL; 2005.⁽¹³¹⁾

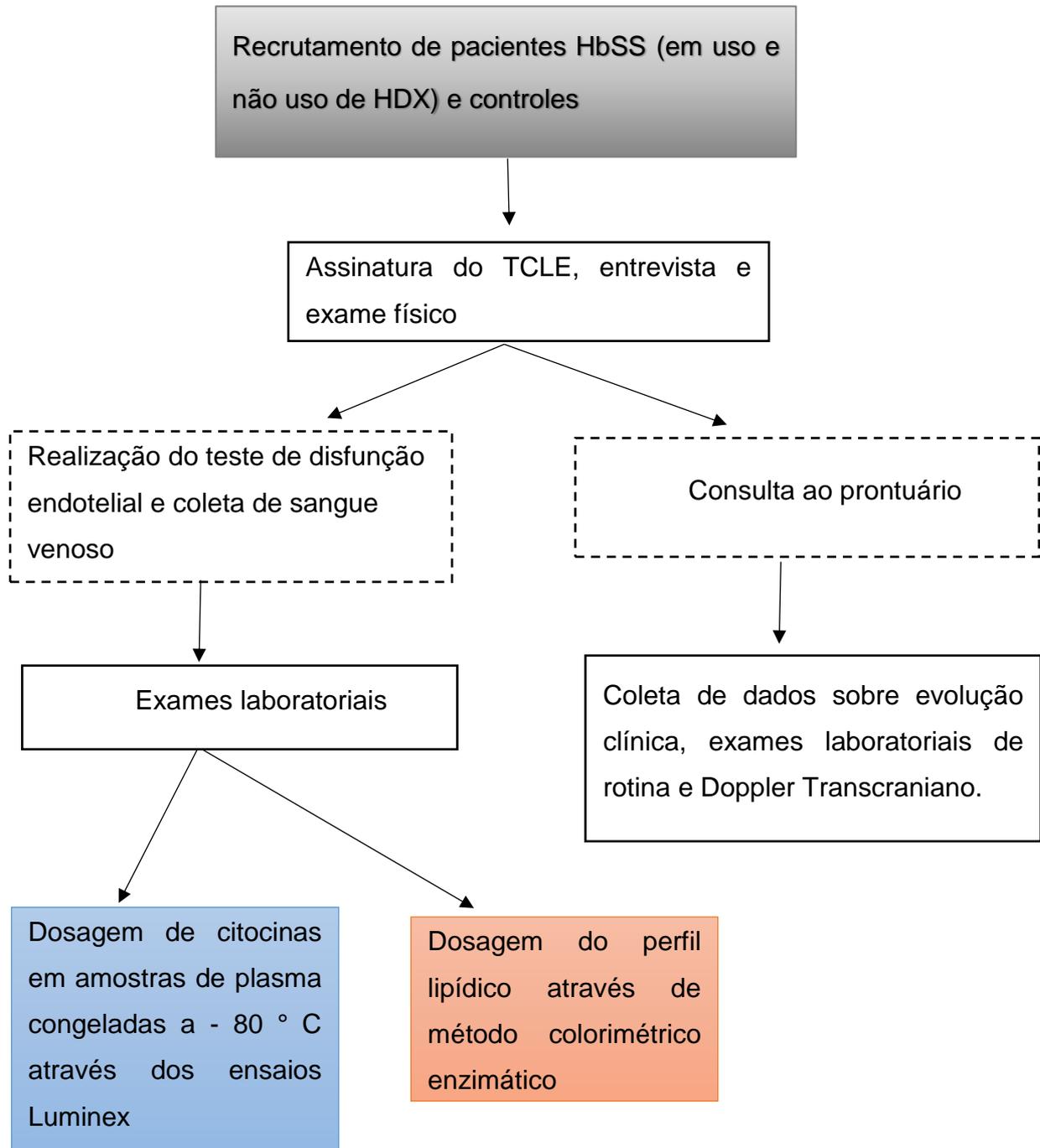
Este método pode ser realizado avaliando a resposta vasodilatadora endotélio-dependente nas artérias radial, axilar e femoral. Diâmetros inferiores a 2,5 mm não são recomendados por serem difíceis de medir. Aumento da idade, sexo masculino, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, tabagismo, hipercolesterolemia,

obesidade, baixo peso ao nascimento, hiper-homocisteinemia, doença cardiovascular, aumento de catecolaminas (stress), estrógeno, ingestão de açúcar e gordura são fatores que afetam a VMF. Recomenda-se que o exame seja realizado entre 7:00 e 10:00h da manhã porque a VMF sofre variação diurna. Importante, que os testes sejam realizados por um único examinador para garantir uma elevada reprodutibilidade.⁽¹³¹⁾

Em pessoas saudáveis, a VMF é de 7 a 10% de ^(132,133) diâmetro da linha de base, mas em pacientes com doença cardiovascular a VMF é deficiente ou ausente, com valores de 0 a 5%.⁽¹³¹⁾ Em crianças e adolescentes não existem valores estabelecidos. Järvisalo *et al* ⁽¹³⁴⁾ através de estudo com amostra de 105 crianças saudáveis com média de idade 10 anos (variação de 9 a 16 anos), sugere utilizar como limite inferior da normalidade valores da VMF abaixo do percentil 10. Andrade *et al*⁽¹³⁵⁾ estudando valores normais da VMF em adolescentes normotensos sem fatores de risco para HAS também utiliza o critério do percentil 10 como limite inferior da VMF.

Estudo realizado anteriormente, avaliando a VMF de 40 crianças e adolescentes com AF, comparados a 25 controles saudáveis, encontrou VMF = 8,4% como valor de corte para disfunção endotelial, conforme critério de Jarvisalo. Após estratificação da amostra de acordo com a presença de disfunção endotelial não foi observado diferença na frequência de manifestações clínicas e endoteliais. Entretanto utilizando o valor de corte de 6,65% estabelecido através de Curva ROC para disfunção endotelial, observou-se maior frequência de STA em pacientes com percentual de VMF abaixo deste valor.⁽¹¹²⁾

4 DESENHO EXPERIMENTAL DO ESTUDO



Análise estatística: SPSS versão 20.0; software JMP 10.0

5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo

Estudo transversal, analítico com grupo de comparação

5.2 Período do Estudo

A coleta de dados foi realizada de 1º de junho de 2014 a agosto de 2016, envolvendo 65 pacientes para o mestrado em Medicina e Saúde, ampliada para o doutorado.

5.3 População Alvo

Crianças e adolescentes com anemia falciforme em tratamento com HDX e grupo não tratado com HDX; crianças e adolescentes saudáveis para o grupo de comparação.

5.4 População Acessível

Crianças e adolescentes de 6 a 18 anos de idade, com diagnóstico de Hemoglobinopatia SS, matriculadas e acompanhadas no Ambulatório de Hematologia do Ambulatório Magalhães Neto – Complexo Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) da Faculdade de Medicina da Bahia - UFBA e na Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA), centros de referência no atendimento e tratamento de doenças hematológicas.

Crianças e adolescentes da mesma faixa etária, sem doença falciforme e sem outras doenças agudas ou crônicas, matriculadas no ambulatório docente-assistencial de pediatria geral do Hospital Geral Roberto Santos (HGRS) / Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) e no ambulatório de Hebiatra do Ambulatório Magalhães Neto – Complexo HUPES da Faculdade de Medicina da Bahia - UFBA.

A faixa etária do estudo foi selecionada por razões técnicas para a realização do teste de disfunção endotelial.

5.5 Amostra

5.5.1 Técnica de Amostragem

Foi obtida amostra de conveniência de crianças e adolescentes nos ambulatórios de acompanhamento e que preenchiam os critérios de elegibilidade.

5.5.2 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo amostral foi realizado tendo como base a primeira etapa do estudo que avaliou a função endotelial de crianças e adolescentes com AF e sua associação com comorbidades.⁽¹¹²⁾

O tamanho da amostra foi calculado baseado no desvio padrão da média de dilatação da artéria braquial, obtido em trabalho publicado na literatura de 0,2, comparando 2 grupos, para detectar diferença de 0,25.¹³⁶ Foi considerado erro alfa de 0,05 e poder de 90%. Total de 30 indivíduos, 15 com HbSS e 15 sem hemoglobinopatia. Considerando dificuldades técnicas com a faixa etária pediátrica definiu-se 60 indivíduos, 20 em uso de hidroxiuréia, 20 em não uso de hidroxiuréia e 20 sem hemoglobinopatias, o cálculo foi executado através do programa de estatística WinPepi®.

5.6 Critérios de elegibilidade

5.6.1 Critérios de inclusão

5.6.1.1 Grupo HbSS

- Faixa etária de 6 anos a 18 anos
- Hb SS diagnosticado por eletroforese de Hb e/ou cromatografia líquida de alta performance
- Ausência de eventos agudos há um mês
- Sem quadros infecciosos há um mês
- Assinatura do TCLE, indicando concordância em participar do estudo;

5.6.1.2 Grupo sem HbSS

- Faixa etária de 6 a 18 anos
- Aparentemente saudáveis, sem diagnósticos de patologias agudas.
- Hb AA, obtida por eletroforese de Hb e/ou cromatografia líquida de alta performance
- Ausência de infecções no último mês
- Indicador IMC/idade abaixo do escore Z +2, segundo curva da OMS
- Ausência de doenças crônicas
- Assinatura do TCLE, indicando concordância em participar do estudo;

5.6.2 Critérios de exclusão

5.6.2.1 Grupo HbSS

- Acidente vascular encefálico prévio
- Transfusão sanguínea há menos de 3 meses

5.6.2.2 Grupo sem HbSS

- Quadros infecciosos agudos, durante o processo de realização de exames
- Doenças crônicas
- Dislipidemia

Por serem fator de risco para disfunção endotelial

5.7 Definições e Operacionalização das Variáveis

5.7.1 Variáveis Dependentes

Colesterol total (CT) mg/dl, lipoproteína de alta densidade colesterol (HDL-c) (mg/dl), lipoproteína de baixa densidade colesterol (LDL-c) (mg/dl), triglicérides (TG) (mg/dl), razão TG/HDL-c e as interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL 12p70, IL-17A e TNF- α (pg/ml), consideradas como variáveis contínuas.

5.7.2 Variáveis Independentes

5.7.2.1 Variáveis clínicas e sociodemográficas

Sexo (M, F), idade (a), índice de massa corpórea (Kg/m^2), Saturação periférica de oxihemoglobina (%), Pressão arterial sistólica e diastólica (mm Hg) número de crises vasclusivas (CVO) no último ano, número de atendimento em unidade de urgência-emergência por CVO no último ano, número de internações por CVO no último ano, episódios de STA no último ano, tempo de internamento por STA (dias), ocorrência de osteomielite, priapismo, osteonecrose, sequestro esplênico, esplenectomia, número de transfusões no último ano, número de transfusões até o momento do estudo, uso ou não de hidroxiuréia (HDX).

5.7.2.2 Variáveis laboratoriais

Hematócrito (%), hemoglobina (g/dl), volume globular médio (fL), concentração de hemoglobina corpuscular média (pg), leucograma ($\times 10^9/\text{L}$), plaquetas ($\times 10^9/\text{L}$), reticulócitos (%), Lactato desidrogenase (U/L), transaminases (U/L), bilirrubinas totais (mg/dl), bilirrubina indireta (mg/dl), bilirrubina direta (mg/dl), glicemia (mg/dl), proteína C reativa quantitativa de alta sensibilidade (mg/L). A velocidade de fluxo sanguíneo na artéria cerebral média direita e esquerda (cm/s) foi descrita como contínua e a classificação do Doppler transcraniano foi descrita como categórica. Utilizado critério de Adams *et al* que definiu os valores para a velocidade de fluxo sanguíneo: até 170 cm/s (normal); de 170 a 200cm/s (condicional); e maiores que 200cm/s (crítico/anormal), com risco alto de desenvolver AVE em crianças de 2 a 16 anos.⁽¹³⁷⁾ Este exame foi realizado por 2 operadores independentes que avaliavam pacientes do Ambulatório de Hematologia do Ambulatório Magalhães Neto- Complexo HUPES e do HEMOBA. A disfunção endotelial foi avaliada por método ultrassonográfico com Doppler, através do método da hiperemia reativa da artéria braquial.

5.7.3 Definição de eventos clínicos

Estes dados foram colhidos através do questionário padronizado e de consulta ao prontuário

Crise vasoclusiva (CVO):⁽¹³⁸⁾ manifestação dolorosa com necessidade de analgesia.

CVO com limitação física: CVO com limitação para atividades laborativas ou frequência à escola.

Síndrome torácica aguda:⁽¹³⁹⁾ infiltrado pulmonar novo envolvendo pelo menos um segmento do pulmão, afastado atelectasia, com uma ou mais das seguintes manifestações: dor torácica, taquipnéia, tosse, sibilância, aumento do trabalho respiratório e/ou hipoxemia (paO₂ < 60 mmHg ou SpO₂ abaixo de 2% do basal).

Acidente Vascular Encefálico:⁽¹⁴⁰⁾ Alterações de consciência, déficits neurológicos focais, convulsões, paresias, afasia, confusão mental e cefaleia de grande intensidade ou duração associada a lesões de isquemia ou hemorragia na Ressonância magnética do crânio.

5.7.4 Critérios de gravidade ^(125,141)

- Três ou mais episódios de crises de dor/ano com necessidade de atendimento médico hospitalar;
- Síndrome torácica aguda: dois ou mais eventos/ano ;
- Hipoxemia crônica: saturação de oxigênio persistentemente menor que 94%;
- Comprovação de lesão crônica de órgão (priapismo, necrose óssea);
- Concentração de Hb persistentemente menor que 7 g/dl;
- Contagem de leucócitos maior que 20 x 10⁹/L na ausência de infecção;
- Duas medidas consecutivas do fluxo das artérias cerebrais média ou anterior por Doppler transcraniano com velocidade entre 170 e 199 cm/s (inclui pacientes com história prévia de isquemia cerebral transitória);
- Desidrogenase láctica maior que duas vezes o valor superior de normalidade (LDH > 960 U/L).

5.7.5 Definição de critérios de dislipidemia ⁽¹⁴²⁾

Colesterol total > 170 mg/dl

HDL- c < 45 mg/dl

LDL- c > 130 mg/dl

Triglicérides > 130 mg/dl

TG/HDL-c > 2,73 mg/dl ⁽¹⁴³⁾

5.7.6 Definição de critérios para o Doppler Transcraniano⁽¹³⁷⁾

Fluxo 170 cm / s (normal)

Fluxo entre 170 a 200cm / s (condicional)

Fluxo maior que 200cm / s (anormal)

5.8 Protocolo de coleta de dados

5.8.1 Avaliação clínica através de questionário estruturado

Os pacientes foram alocados no momento da visita aos ambulatórios de acompanhamento e entraram no estudo após representante legal e paciente, anuírem por consentimento livre e informado. Um questionário padrão foi utilizado para obtenção de dados clínicos e sociodemográficos, complementados com informações do prontuário. (Anexo 1)

5.8.2 Exame físico

5.8.2.1 *Peso*

Utilizado balança digital

- a) Remover casaco, objetos e sapatos.
- b) Calibrar o zero.
- c) Posicionar a criança ou adolescente no centro da plataforma, com os dois pés.

- d) Fazer a leitura em quilogramas, com aproximação de 100g, de acordo com a escala.

5.8.2.2 *Altura*

Foi utilizado estadiômetro portátil com precisão de 0,1cm

- a) Remover sapatos e acessórios de cabelo que possam interferir na medida feita em centímetros.
- b) Manter posição ereta, com as mãos ao lado do corpo e joelhos e calcanhares juntos, tocando a base vertical.

5.8.2.3 *IMC*

O índice de massa corporal (IMC) foi calculado pela fórmula de Quetelet: quociente do peso pelo quadrado da altura (kg/m^2).

Classificação, segundo referência da OMS (2007) ¹⁴⁴ - faixa etária de 6 a 19 anos

Magreza acentuada escore $z < - 3$

Magreza escore $z > - 3$ e $< - 2$

Eutrófico escore $z > - 2$ e $< +1$

Sobrepeso escore $z > +1$ e $< +2$

Obesidade escore $z > +2$ e $< +3$

Obesidade grave escore $z > +3$

5.8.2.4 *Medida da pressão arterial (PA)*

Foi realizada após 5 minutos de repouso, na posição sentada. Foram utilizados manguitos nos tamanhos 12 e 14 cm de largura e 36 e 53 cm de extensão, a depender do comprimento e circunferência do braço. A largura do manguito ocupou 40% do comprimento do braço, medida no ponto médio entre o cotovelo e o acrômio, e o comprimento, 80 a 100% desta medida. O manômetro utilizado foi de coluna de mercúrio. A medida da pressão arterial foi feita com a campânula do

estetoscópio colocada 02 cm acima da fossa cubital direita, sobre o pulso braquial, identificado por palpação digital, com o membro apoiado à altura do coração. A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida quando do aparecimento dos sons cardíacos (fase I de Koroktoff) e a pressão arterial diastólica (PAD) quando do seu desaparecimento (fase V); ⁽¹⁴⁵⁾ o valor final da PA representou a média de três medidas consecutivas, medidas com intervalos de 60 segundos.

5.8.2.5 Oximetria de pulso

A saturação arterial da oxihemoglobina (SpO₂) diurna, em repouso, foi avaliada por um oxímetro de pulso (Oximed), durante dez minutos, logo após a chegada da criança ao serviço, estando a criança tranquila, no dia da sua inclusão no estudo.

5.8.3 Avaliação da função endotelial

Para avaliação da função endotelial, empregamos protocolo estabelecido segundo Diretrizes para a avaliação ultrassonográfica da artéria braquial.⁽¹⁴⁶⁾ Os exames foram realizados no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular - EBMSP após agendamento prévio, em equipamento VIVID 3 General Electric Company - Israel, com transdutor multifrequencial de 7 a 12 MHz. A função vasomotora dependente do endotélio foi avaliada por dilatação mediada pelo fluxo com hiperemia reativa. Os exames foram realizados com os pacientes em jejum de 4 h, após repouso de 30 minutos, com temperatura da sala controlada para 20 a 25°C. Para evitar variações circadianas todos os exames foram realizados no período matutino. Os pacientes foram examinados em decúbito dorsal, com o braço esquerdo posicionado ergonomicamente; eletrocardiograma sincronizado; verificação da frequência cardíaca e pressão arterial antes, durante e após o exame. A braçadeira do esfigmomanômetro de coluna de mercúrio, exercendo a função de um torniquete pneumático envolvendo o braço direito acima da prega do cotovelo; a artéria braquial identificada em secção longitudinal e posteriormente identificados a luz, o centro e a interface lúmen-íntima da parede anterior e posterior do vaso; a amostra de Doppler posicionada em ângulo de 60°; adequação de controles da escala de

cinza, profundidade, filtro e escala do Doppler. O aumento do fluxo foi induzido pela insuflação do torniquete ao redor do braço até 250 mmHg, por quatro minutos, com monitorização contínua da imagem da artéria seguida de desinsuflação do torniquete, levando à hiperemia reativa; monitorização dos primeiros cinco fluxos (mensuração da velocidade máxima Doppler) e do diâmetro da artéria, durante 120 segundos (para medida do diâmetro ao final de 60 segundos). Vale ressaltar que o exame foi muito bem tolerado pelos participantes, não havendo referência de qualquer desconforto que tenha necessitado da interrupção do teste. Os exames foram realizados por médico com treinamento específico para realização do exame e com comprovada experiência na técnica⁽¹⁴⁷⁾. Nas figuras abaixo estão apresentadas as principais etapas da avaliação da função endotelial (figuras 15,16,17,18 e 19).

Disfunção endotelial será considerada quando a VMF estiver abaixo do valor correspondente ao percentil 10 do grupo saudável, conforme critérios definidos por Jarvisalo e Andrade. ^(134,135)



Figura 14 - Fotografia do fluxo sanguíneo da artéria braquial no estado basal
 Determinação do fluxo da artéria braquial no estado basal através do Doppler pulsado
 Fonte: Arquivo pessoal

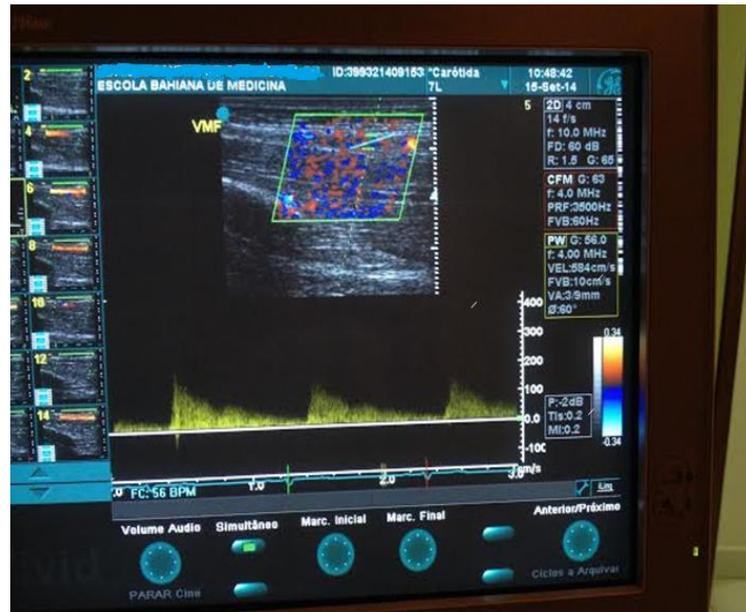


Figura 15 - Fotografia do fluxo sanguíneo da artéria braquial no período de hiperemia reativa

Determinação do Fluxo da artéria braquial através do Doppler pulsado no período de hiperemia reativa



Figura 16 - Fotografia do diâmetro da artéria braquial em estado basal

Diâmetro da artéria braquial através de ultrassonografia de alta resolução no estado basal

Fonte: Arquivo próprio



Figura 17 - Fotografia do diâmetro da artéria braquial no período de vasodilatação
Diâmetro da artéria braquial através de ultrassonografia de alta resolução no período de hiperemia reativa.

Fonte: Arquivo pessoal

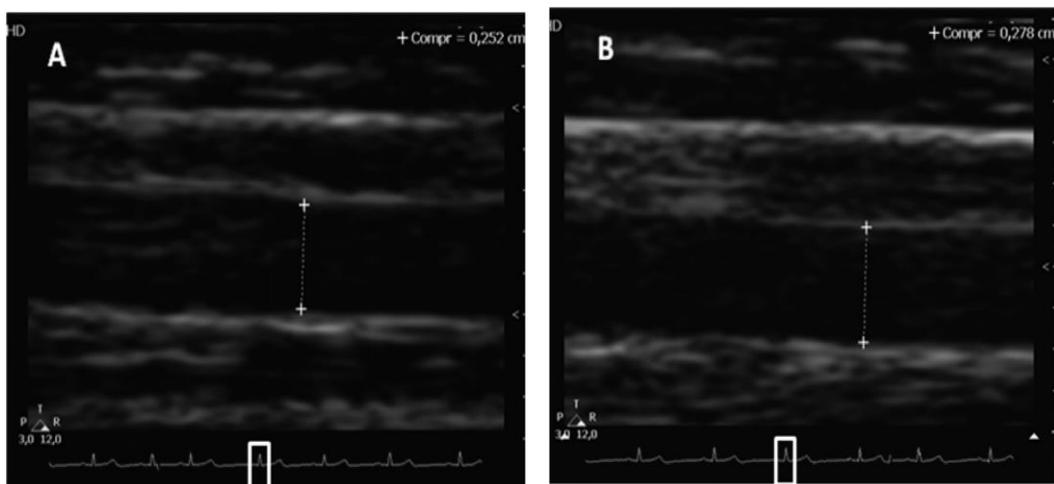


Figura 18 - Cálculo da vasodilatação mediada por fluxo

Dilatação mediada por fluxo (%) = $(\text{diâmetro B} - \text{diâmetro A} / \text{diâmetro A}) \times 100$

Fonte: Costa et al 2012⁽¹⁴⁸⁾

5.8.4 Coleta de sangue

Realizado por técnico habilitado e com experiência comprovada, no ADAB-EBMSP. Cerca de 10 ml de sangue foram colhidos por punção venosa, de cada

paciente, após jejum mínimo de 12 horas, em frascos secos para as dosagens bioquímicas e frasco com EDTA para realização de hemograma. Após centrifugação, o soro foi armazenado em freezer, a -80°C . Foram dosados: Colesterol total (CT), HDL-C, TG. As dosagens do CT, HDL-C e triglicérides (TG) foram realizadas por método colorimétrico enzimático, em laboratório de referência. O LDL-C foi calculado pela fórmula Friedwald: $\text{LDL-c} = [(\text{CT} - \text{HDL-c}) - \text{TG}/5]$, com $\text{TG} < 400\text{mg/dl}$. PCR quantitativa de alta sensibilidade foi mensurada pelo método de turbidimetria. As citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A e TNF α foram dosadas a partir de amostras de plasma purificadas e armazenadas congeladas a -80°C através dos ensaios Luminex em lotes (Bio-Rad, Hercules, CA).

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

6.1 Hipótese científica

Na AF inflamação, hemólise, disfunção endotelial e alteração no metabolismo lipídico interagem determinando quadros clínicos de maior ou menor gravidade. As citocinas tem papel importante na inflamação, encontrando-se elevada em faixas etárias precoces. É provável que elevação de citocinas e alterações no perfil lipídico determinem formas mais severas da doença. O uso de HDX pode modificar estas alterações.

6.2 Estatística Descritiva

Para a análise descritiva, as variáveis quantitativas foram representadas por suas médias e desvios-padrão quando suas distribuições foram normais e por medianas e intervalos interquartis quando não normais. As variáveis categóricas foram representadas através de frequências simples e porcentagens. Para testar a hipótese de que os dados apresentavam uma distribuição normal foram aplicados os testes de normalidade: *Kolmogorov-Smirnov* e o *Shapiro Wilk*.

Todas as variáveis colhidas dos pacientes foram transferidas para o banco de dados do software IBM - *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*, Chicago, IL, EUA. 20.0, ano 2012 e analisados pelo mesmo pacote estatístico.

6.3 Análise Bivariada e Multivariada

Para comparar proporções foi utilizado análise bivariada através do teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher quando necessário. Para comparar médias foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes e Mann Whitney para comparar medianas de variáveis numéricas com distribuição não paramétrica. Para comparar médias de variáveis numéricas em mais de dois grupos categorizados foi utilizado ANOVA com correção de Bonferroni ou Kruskal Wallis, para comparação de ranks, se distribuição não paramétrica.

Realizado correlação de Spearman para avaliar correlações entre as variáveis numéricas.

Usando o software JMP 10.0, os valores médios geométricos (\log_{10}) para cada marcador foram calculados para toda a população estudada. Para avaliar o padrão geral de expressão de citocinas, marcadores de hemólise, disfunção endotelial e perfil lipídico em cada grupo, o *heat map* foi construído usando a variação de valores médios geométricos calculados para cada biomarcador candidato. A análise de agrupamento, usando o método de Ward foi empregado para revelar os padrões dos marcadores, valorizando a variação entre os grupos.

6.4 Aspectos Éticos

Em cumprimento às normas da resolução N° 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012), esta pesquisa foi aprovada pelos comitês de ética da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, parecer n° 568.913 /2014 e CAEE – 17663913.2.0000 5544 (Anexos 8 E 12). O acesso aos dados de registro foi autorizado pelas diretorias do HGRS, da FMB – UFBA, para acesso ao ambulatório de hebiatria do Ambulatório Materno-Infantil Professor Nelson Barros, do Ambulatório Docente-Assistencial de Hematologia Pediátrica - Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos e do HEMOBA (Anexos 4,5,6 e 7). O uso do Laboratório de Cardiologia para realização do teste de vasodilatação mediado por fluxo da artéria braquial foi autorizado pela Coordenação do Ambulatório Docente-assistencial de Brotas da EBMSP.

O termo de consentimento e de assentimento foram realizados em conjunto e assinados pelo paciente e seu responsável.

Quanto aos riscos aos quais os pacientes foram submetidos, consta a exposição dos dados de registros de atendimentos. Os autores se comprometeram a manter absoluto sigilo sobre as informações.

7 RESULTADOS

A amostra foi constituída por 96 indivíduos distribuídos em 3 grupos: um grupo formado por 31 portadores de HbSS não tratados com HDX (AF HDX não), outro grupo formado por 24 portadores de HbSS em tratamento com HDX (AF HDX sim) e 41 crianças e adolescentes saudáveis que pertenciam ao grupo controle (GC). As médias de idade em anos e desvio-padrão foram semelhantes: $13,2 \pm 2,8$; $11,5 \pm 3,0$ e $11,4 \pm 3,2$ $p=0,054$ respectivamente. O sexo masculino foi semelhante entre os grupos: AF HDX não 17(56,7%), AF HDX sim 13(54,2%), GC 14(43,1%) $p=0,115$.

Os grupos foram constituídos por indivíduos não brancos, 90% AF HDX não, 100% AF HDX sim e 87,5% GC ($p=0,222$). Os grupos com AF apresentaram média \pm DP mais baixa do IMC $p=0,013$, do escore z do IMC $p=0,005$, da saturação periférica de oxigênio $p<0,001$, hemoglobina $p<0,001$ e da glicemia $p=0,013$, quando comparados ao GC. A maior diferença de média do IMC ficou entre os grupos AF HDX sim e GC ($-2,28 \pm 0,81$ $p=0,017$). Quanto a glicemia a maior diferença de média ocorreu entre os grupos AF HDX sim e GC ($-11,35 \pm 4,17$ $p=0,029$). Os grupos AF apresentaram médias \pm DP mais elevadas de leucócitos $p<0,001$, volume globular médio (VGM) $p<0,001$, plaquetas $p<0,001$, reticulócitos $p<0,001$, desidrogenase láctica (LDH) $p<0,001$, bilirrubina total (BT) $p<0,001$, bilirrubina indireta (BI) $p<0,001$, bilirrubina direta (BD) $p=0,008$ e de aspartato aminotransferase (AST) $p<0,001$. Os grupos AF foram semelhantes ao grupo controle quanto a pressão arterial sanguínea sistólica $p=0,261$, pressão sanguínea diastólica $p=0,277$ e alanina aminotransferase (ALT) $p=0,071$. Os grupos AF HDX não e AF HDX sim, diferiram entre si, quanto aos valores de LDH, mais elevado no grupo HDX não, com diferença de média $388,98 \pm 156,41$, $p=0,049$, quanto ao VGM, mais elevado no grupo HDX sim, com diferença de média de $8,05 \pm 2,73$, $p=0,014$ e quanto a saturação periférica de oxigênio, mais elevada no grupo HDX sim com diferença de média $2,08 \pm 0,80$ $p=0,033$. A média \pm DP de hemoglobina fetal (HbF) foi semelhante entre os grupos HDX não ($6,794 \pm 5,29$) e HDX sim ($8,635 \pm 6,41$) $p=0,389$. **(Tabela 2)**

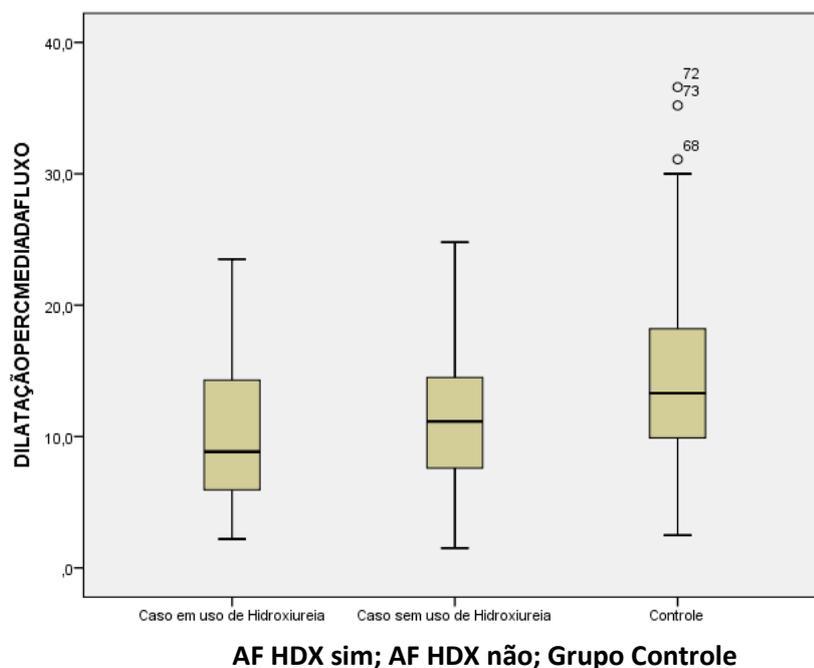
Tabela 2 - Características dos grupos estudados: Anemia Falciforme não tratados com hidroxiuréia (AF HDX não); AF tratados com HDX (AF HDX sim) e Grupo Controle

Características	AF HDX não (n=31)	AF HDX sim (n=24)	Controle (n=41)	Valor de p
Média ± DP				
Idade (anos)	13,20 ± 2,82	11,46 ± 3,49	11,41 ± 3,17	0,054
Gênero masculino n(%)	17(56,70)	13(54,20)	14(43,10)	0,115
Não-brancos n(%)	27(90,00)	24(100)	35(87,50)	0,209
Índice de massa corpórea*	16,85 ± 2,34	16,32 ± 2,22	18,61 ± 3,96	0,013
Z escore **	-1,01 ± 0,95	-0,88 ± 1,05	-0,12 ± 1,36	0,005
Saturação periférica de Oxigênio (%)*+§	91,29 ± 4,23	95,05 ± 2,52	97,66 ± 0,97	<0,001
Pressão arterial sistólica (mmHg)	98,75±11,03	96,67±12,11	95,94±10,52	0,261
Pressão arterial diastólica(mmHg)	58,75±9,04	53,33±10,32	60,31± 11,89	0,277
Hb (g/dl) **	7,92 ± 0,79	8,18 ± 0,91	13,12 ± 1,10	<0,001
HbF (g/dl)	6,79 ± 5,29	8,64 ± 6,41	—	0,389
Volume Globular médio*§ (fL)	86,86 ± 9,81	94,91±10,61	83,42± 6,78	0,001
Leucócitos (x 10 ⁹ /L) **	12,59 ± 3,20	11,68 ± 4,31	7,21 ± 1,53	<0,001
Plaquetas (x 10 ⁹ /L) **	457,92±106,48	469,68±148,42	281,16±47,32	<0,001
Reticulócitos (%)**	7,81 ± 5,38	7,28 ± 4,64	0,78 ± 0,24	<0,001
LDH (U/L) **§	1356,45±650,16	980,25±432,05	392,57±35,92	<0,001
AST (U/L) **	55,02 ± 21,62	47,24 ± 22,23	23,16 ± 12,28	<0,001
ALT (U/L) **	27,93 ± 18,47	26,10 ± 16,11	16,79 ± 8,79	0,071
BT (mg/dL) **	3,496±2,123	2,955±1,579	0,426±0,261	<0,001
BI (mg/dL) **	2,74±2,053	2,48±1,58	0,33 ± 0,19	0,001
BD (mg/dL) **	0,87±0,94	0,48±0,32	0,09 ± 0,08	0,008
Glicemia (mg/dL)*	81,44 ± 10,01	79,13 ± 10,52	89,47 ± 9,04	0,013
VMF%**	10,08 ± 3,84	8,58 ± 4,44	18,21 ± 7,62	0,004

Nota: ANOVA a um só fator e teste pos hoc de Bonferroni para variáveis numéricas com distribuição normal. Qui-quadrado para variáveis categóricas. Teste t de Student para comparar 2 amostras independentes. * Indica que a diferença está entre o grupo controle e o grupo AFHDX sim. + Indica que a diferença está entre o grupo controle e grupo HDX não. §Indica que a diferença está entre os grupos com Anemia Falciforme. Hb (hemoglobina), HbF (hemoglobina fetal); ALT (alanina aminotransferase) AST (aspartato aminotransferase); BT (Bilirrubina Total); (BI) Bilirrubina Indireta; Bilirrubina direta (BD); VMF (vasodilatação mediada por fluxo).

A VMF foi mais baixa nos grupos AF HDX não e AF HDX sim, comparados ao GC ($10,08\% \pm 3,84$; $8,58\% \pm 4,44$ vs $18,21 \pm 7,62\%$ $p=0,004$) e semelhante entre os grupos AF HDX não e AF HDX sim $p=1,000$. (**Gráficos 1**) O valor de corte para disfunção endotelial foi 8,5% (percentil 10 do grupo comparação). No grupo AF o valor da VMF no percentil 10 foi 4,8%, e no percentil 50 foi 10%. Disfunção endotelial predominou no grupo AF, 20 (36,4%) vs grupo controle 4 (9,8%), porém não houve diferença entre os grupos AF HDX não e AF HDX sim, 9 (30%) vs 11(45,8%) $p=0,231$.

Gráfico 1 - Comparação da vasodilatação mediada por fluxo (Dilatação per mediada de fluxo) entre os grupos Anemia Falciforme em uso de HDX, não uso de HDX e grupo comparação



A análise dos níveis de citocinas entre os grupos AF HDX não, AF HDX sim e GC não demonstraram diferença significativa. A PCR-as foi mais elevada nos grupos AF vs GC $p=0,003$ e foi semelhante entre os grupos AF HDX não e HDX sim ($p=0,703$). (**Tabela 3**)

Tabela 3 - Comparação dos valores das interleucinas e da proteína C reativa entre os grupos Anemia Falciforme não tratados e tratados com HDX e grupo controle em Salvador-BA, entre junho de 2014 a março 2016.

Citocinas e PCR as	Grupo AF HDX não Mediana (IQ)	Grupo AF HDX sim Mediana (IQ)	Grupo Controle Mediana (IQ)	P
IL12 (pg/ml)	1,18(0,26-18,61)	1,14(0,07-18,61)	1,02(0,01-6,58)	0,645
TNF α (pg/ml)	10,31 (2,11-28,42)	9,54 (1,05-68,90)	8,30 (0,74-80,74)	0,971
IL 17A (pg/ml)	2,35 (0,86-5,77)	2,58(0,52-21,67)	1,96(0,59-12,64)	0,338
IL 1b (pg/ml)	3,11(0,32-11,89)	3,44(0,22-93,68)	3,32(0,23-74,67)	0,606
IL 6 (pg/ml)	5,95 (0,15-59,69)	9,07 (0,64-133,87)	7,08(0,23-74,67)	0,153
IL 8 (pg/ml)	10,43(1,87-103,12)	17,35(4,00-113,08)	9,58(1,35-52,12)	0,519
IL10 (pg/ml)	6,92(0,17-25,45)	6,33(1,25-48,7)	6,76(0,57-52,53)	0,606
PCR as (mg/L)	2,23(0,22-15,65)	2,64(0,37-22,00)	0,80 (0,08-19,99)	0,003

Nota: Kruskal-Wallis (variáveis numéricas com distribuição não normal). IL (interleucinas); TNF α (Fator de necrose tumoral alfa); PCR as (proteína C reativa quantitativa de alta sensibilidade).

Quanto ao perfil lipídico o grupo AF apresentou médias mais baixas de colesterol total, HDL-c, LDL-c e níveis mais elevados de triglicérides e da razão TG/HDL-c. Não houve diferença do perfil lipídico entre os grupos tratados e não tratados com HDX. A média de TG foi mais alta no AF HDX não, com diferença de média $38,79 \pm 9,03$, $p < 0,001$, quando comparado ao GC. (**Tabela 4**)

Tabela 4 - Comparação do perfil lipídico entre os grupos anemia falciforme (AF) não tratados com hidroxiuréia (AF HDX não), AF tratados com HDX (AF HDX sim) e grupo controle (GC).

Perfil lipídico	Grupo AF HDX não	Grupo AF HDX sim	Grupo Controle	p
Colesterol total (mg/dl) **	124,23 \pm 22,45	114,72 \pm 24,63	153,73 \pm 26,45	<0,001
LDL-c (mg/dl) **	72,20 \pm 22,04	64,34 \pm 20,93	90,43 \pm 22,52	<0,001
HDL-c (mg/dl) **	31,63 \pm 8,64	35,16 \pm 18,61	47,03 \pm 11,7	<0,001
Triglicérides (mg/dl) +	112,86 \pm 51,35	96,93 \pm 31,20	74,07 \pm 25,87	<0,001
TG/HDL-C**	3,96 \pm 2,34	3,22 \pm 1,89	1,70 \pm 0,83	<0,001

Nota: ANOVA teste a um só fator com teste pos hoc de Bonferroni. * Indica que a diferença está entre o grupo controle e os grupos AF HDX sim. + Indica que a diferença está entre grupo controle e grupo HDX não. HDL (lipoproteína de alta densidade-colesterol), LDL (lipoproteína de baixa densidade-colesterol); TG/HDL-C (razão Triglicérides/ lipoproteína de alta densidade-colesterol).

Os pacientes com anemia falciforme não tratados e tratados com hidroxiuréia foram comparados quanto as manifestações clínicas da doença, observando-se semelhança entre os grupos (**Tabela 5**), exceto quanto ao número total de transfusões sanguíneas que apresentou mediana IQ mais elevada no grupo tratado com HDX 7(5-17) vs 3 (3-8), $p = 0,01$ (**Tabela 5**). Variáveis relacionadas a manifestações agudas de maior gravidade, como número de crises vasclusivas com necessidade de internamento e número de episódios de STA no último ano tenderam a ser mais elevadas entre os pacientes em uso de HDX ($p=0,09$; $p=0,09$, respectivamente).

O tempo de uso de hidroxiuréia foi variável. O percentual em tratamento a menos de seis meses foi 8,3%(n=2), a menos de dois anos 58% (n=17) e a mais de dois anos 41,7% (n=10).

Tabela 5 - Comparação das manifestações clínicas entre os grupos não tratados com hidroxiuréia (HDX) e tratados com HDX em Salvador - BA de junho de 2014 a agosto de 2016

Características clínicas	Grupo HDX não (n= 31)	Grupo HDX sim (n = 24)	<i>Valor de p</i>
Média ± DP			
ACM direta (Doppler-cm/seg)	132,5 ± 40,5	136,9 ± 30,7	0,71
ACM esquerda (Doppler-cm/seg)	125,9 ± 27,7	140,6 ± 39,4	0,21
Número transfusões no último ano	0,6 ± 1,1	2,4 ± 5,0	0,33
Mediana (IQ)			
Nº CVO ult.ano	2(1,1-2,9)	1,0 (0,7-2,7)	0,60
Nº CVO atend.emergência	1,0(0,8-2,4)	1,0(0,9-2,8)	0,97
Nº internamentos CVO	1,0(0,4-1,6)	1,6(0,9-2,8)	0,09
Nº STA último ano	0,0(0-2)	1,0(0-3)	0,09
Tempo internamento STA	7,0(3,2-33,2)	8,0(4,2-19,1)	0,57
Total de transfusões sanguíneas	3,0(3,2-8,3)	7,0(4,8-17,2)	0,01
n (%)			
CVO com incapacidade física	14 (63,6)	11 (61)	0,56
Síndrome Torácica Aguda	13 (59,1)	14 (77,8)	0,30
Uso de oxigênio STA	9 (40,9)	8 (44,4)	0,70
Transfusão sanguínea STA*	9 (40,9)	9 (50,0)	0,70
Priapismo	3 (13,6)	1 (5,6)	0,60
Sequestro esplênico	3 (10,0)	5 (21,0)	0,26
Colelitíase	7 (25,9)	9 (42,9)	0,22
Enurese	6 (20,0)	4 (17,4)	0,81

Nota: Qui-quadrado para variáveis dicotômicas; Teste t de student para variáveis numéricas. CVO (crise vasclusiva); STA (Síndrome Torácica Aguda); * transfusões sanguíneas durante episódios de STA.

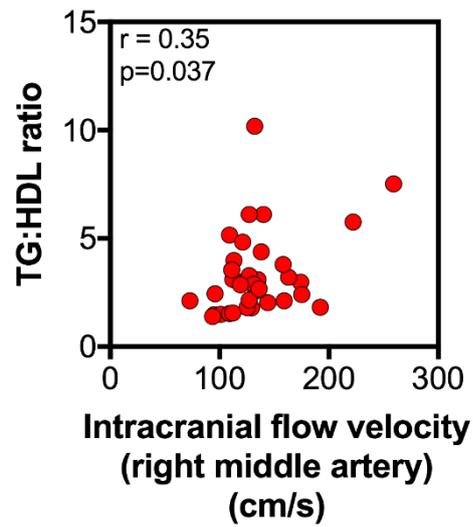
Em relação a classificação do Doppler transcraniano (DTC) foi observado a seguinte distribuição: 31 (56,4%) normais, 6 (10,9%) condicional, 3 (5,5%) anormal e 2 (3,6%) assimétrico. Não houve diferença na classificação do DTC entre os grupos AF tratados e não tratados com HDX ($p=0,467$), destacando-se, porém, um predomínio de laudos condicionais no grupo em uso de HDX 4(20%) vs 1(4,5%).

Foi avaliado correlações entre interleucinas e variáveis indicativas de hemólise, VMF e variáveis clínicas da AF. Houve correlação positiva entre TNF α e número total de transfusões sanguíneas até a entrada no estudo (r_s 0.34, $p=0.016$). Correlação positiva entre número de crises vasclusivas (CVO) no último ano com IL-17A (r_s 0.3, $p=0.048$) e com IL-8 (r_s 0.3 $p=0.03$); correlação positiva entre número de atendimentos em emergência por CVO com IL-8 (r_s 0.3, $p=0.045$) e IL-17A (r_s 0.336 $p= 0.013$) respectivamente. As IL-8 e IL-17A se correlacionaram significativamente (r_s 0,633 $p <0.001$). Observado correlação negativa entre IL-10 e nº de leucócitos (r_s -0.4, $p=0.013$).

Foram estudadas correlações entre perfil lipídico e variáveis inflamatórias (leucócitos, PCRas, interleucinas), variáveis de hemólise (Hb, reticulócitos, LDH, TGO), manifestações agudas da doença, disfunção endotelial, Doppler transcraniano, necessidade de transfusões sanguíneas. A razão TG/ HDL-c se correlacionou positivamente com LDH (r^s 0,30 $p= 0,047$), com contagem de leucócitos (r^s 0,40 $p= 0,006$), com velocidade do fluxo sanguíneo na artéria cerebral direita (r^s 0,35 $p = 0,037$) (**Gráfico 2**) e artéria cerebral esquerda (r^s 0,361 $p=0,026$) (**Gráfico 3**) ao Doppler transcraniano. Ao ser analisado a correlação da variável razão TG/HDL-c e Hb, tomando toda a amostra, foi encontrado r^s - 0,57 $p < 0,0001$. Comparando esta correlação entre os grupos AF e controle observa-se que os controles apresentaram níveis de TG/HDL-c inferiores a mediana. (**Gráfico 4**) O mesmo foi observado ao tomarmos a correlação TG/HDL-c e número total de leucócitos em toda amostra (r^s 0,52 $p < 0,0001$). Ao compararmos os grupos observa-se que o número de leucócitos e de TG/HDL-c no grupo controle estiveram abaixo da mediana. (**Gráfico 5**). Isto demonstra que a elevação da razão TG/HDL-c no grupo AF associa-se a gravidade da anemia e elevação de leucócitos.

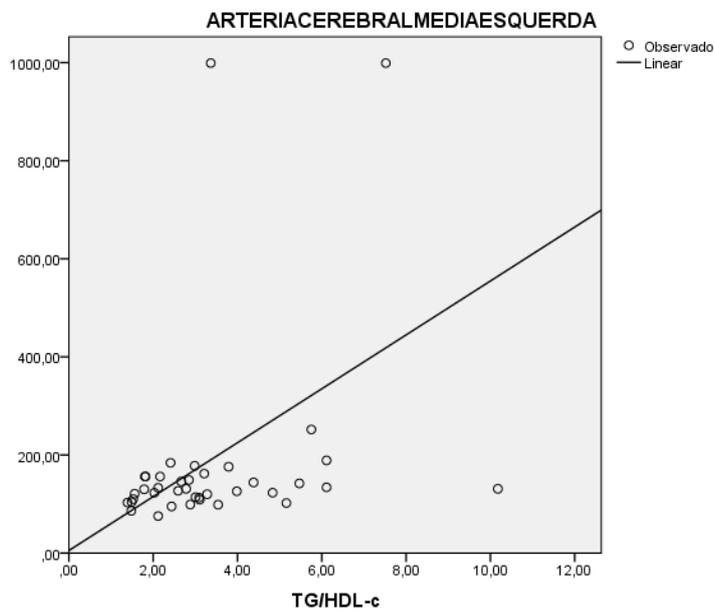
Colesterol total se correlacionou negativamente com PCR as (r^s -0,285 $p=0,04$) e LDL-c com total de transfusão sanguínea (r^s -0,304 $p= 0,032$). (**Tabela 6**) Não houve correlação entre perfil lipídico e a VMF(disfunção endotelial).

Gráfico 2 - Correlação entre TG/HDL-c e Doppler Transcraniano da artéria

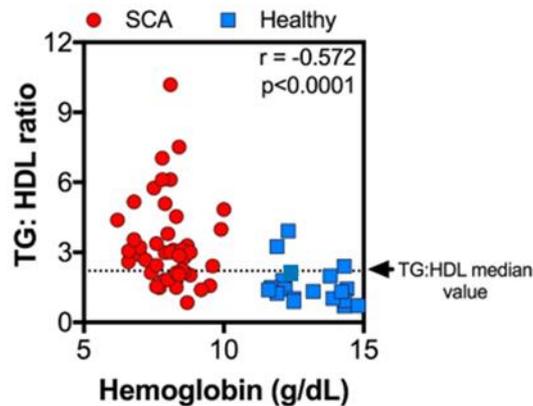


Correlação de Spearman entre a razão TG/HDL-c e velocidade de fluxo na artéria cerebral média direita

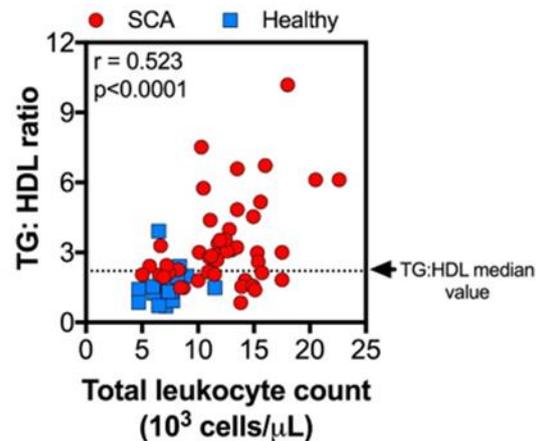
Gráfico 3 - Correlação entre TG/HDL-c e Doppler Transcraniano da artéria



Correlação de Spearman entre a razão TG/HDL-c e velocidade de fluxo na artéria cerebral média esquerda

Gráfico 4 - Correlação TG/HDL-c e nível de Hemoglobina

Correlação de Spearman entre TG/HDL-c e Hemoglobina, tomando toda a amostra e a seguir comparando-os entre os grupos AF(em vermelho) e controles (em azul)

Gráfico 5 - Correlação TG/HDL-c e número total de leucócitos

Correlação de Spearman entre TG/HDL-c e total de leucócitos, tomando toda a amostra e a seguir comparando-os entre os grupos AF(em vermelho) e controles (em azul)

Tabela 6 - Correlações significativas entre perfil lipídico, marcadores de hemólise, marcadores de inflamação e manifestações clínicas no grupo Anemia Falciforme

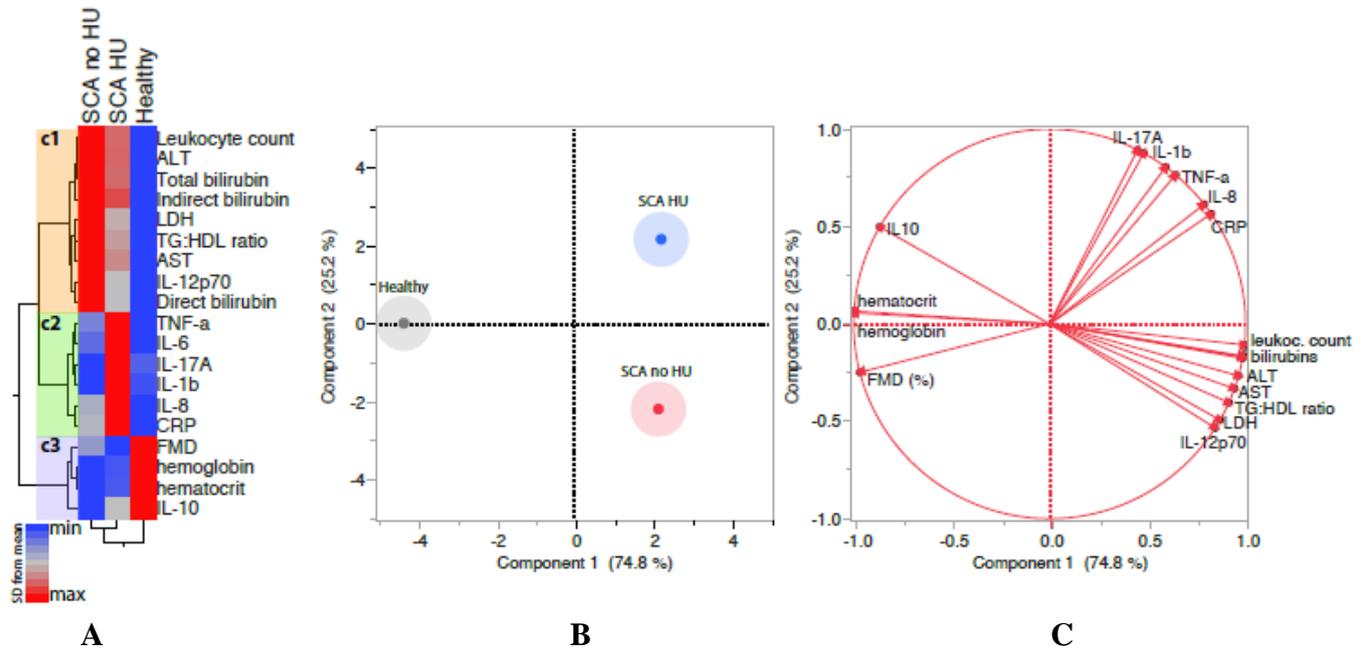
Variáveis	Colesterol		LDL-C		HDL-C		TG/HDL-C	
	r ^s	p	r ^s	p	r ^s	p	r ^s	p
Leucócitos	0,025	0,865	-0,030	0,844	-0,235	0,112	0,396	
LDH	0,002	0,990	-0,103	0,498	0,296	0,071	0,006	
PCRs	-0,285	0,040	-0,123	0,387	-0,110	0,436	0,047	
Total transfusão*	-0,177	0,218	-0,304	0,032	0,054	0,708	0,296	-0,148
Plaquetas	0,038	0,799	-0,079	0,599	0,355	0,021	0,078	-0,225
VF ACD cm/s	0,190	0,261	0,222	0,187	-0,288	0,084	0,134	0,350
VF ACE cm/s	0,016	0,927	-0,023	0,892	-0,187	0,274	0,037	0,361
VMF	0,179	0,196	0,141	0,310	0,075	0,591	0,026	0,048
							0,733	

Nota: r^s Correlação de Spearmann. * Total de transfusões até a inclusão no estudo; PCRas (proteína C reativa de alta sensibilidade); HDL-C (lipoproteína de alta densidade-colesterol), LDL-C (lipoproteína de baixa densidade colesterol, TG/HDL-C (razão triglicérides/colesterol), LDH (Desidrogenase láctica); VF ACD (velocidade de fluxo em artéria cerebral direita); VF ACE (velocidade de fluxo em artéria cerebral esquerda); VMF (vasodilatação mediada por fluxo).

Indivíduos HbSS com TG/HDL-c acima de 2,73 mg/dl apresentaram maior frequência de STA, 24 (70,6%) quando comparados a indivíduos com TG/HDL-c menor que 2,73 mg/dl, 10 (29,4%) $p=0,027$, apresentando razão de prevalência de 1,64, IC 95%(1,09- 2,64) e razão de chance de 3,77, IC 95%;(1,135-12,53). Houve também predomínio de CVO, no grupo com razão TG/HDL-c acima de 2,73 mg/dl, sendo 32 (64%) versus 18 (36%), embora sem significância estatística $p= 0,057$.

Para avaliar a diferença entre os grupos estudados quanto aos marcadores de hemólise (Hb, hematócrito, reticulócitos, LDH, TGO, bilirrubinas), marcadores de inflamação (número total de leucócitos, interleucinas, PCRas), disfunção endotelial mediada por fluxo (VMF) e TG/HDL-c, foi realizada análise de cluster hierárquico expresso através de cores que variaram do azul (valores baixos) até o vermelho intenso (valores elevados). Foi observado que marcadores de hemólise, contagem global de leucócitos e TG/HDL foram mais elevados no grupo não tratado com HDX. Interleucinas, exceto IL-12pq, apresentaram valores mais elevados no grupo tratado com HDX; hematócrito, hemoglobina, VMF e IL-10 foram mais elevados no grupo saudável. **(Gráfico 6A)** A seguir as variáveis foram colocadas no hip map observando-se que se reúnem em 3 sítios distintos, identificados por cores: azul, corresponde ao grupo tratado com HDX; vermelho corresponde ao grupo sem tratamento e cinza ao grupo comparação. **(Gráfico 6B)**. Por fim foi demonstrado, através de vetores, as variáveis que mais contribuíram para a diferenciação entre os grupos. **(Gráfico 6C)**

Gráfico 4 - Análise de cluster hierárquico, análise do componente principal e análise de vetor entre os grupos AF não tratados com Hidroxiúeia (HDX), AF tratados com HDX e grupo saudável



A. Análise de cluster hierárquico entre os grupos tratados com HU (SCA HU), não tratados (SCA no HU) e controles (Healthy), através de escala de cores que variam do azul intenso para valores mais baixos e vermelho intenso para os valores mais elevados **B.** Análise do componente principal. SCA HU (representado em azul), SCA no HU (representado em vermelho) e Healthy (representado em preto). Demonstra o quanto os grupos se diferenciam. **C.** Análise de vetor representa as variáveis que contribuíram para a diferenciação entre os grupos.

8 DISCUSSÃO

A Doença Falciforme tem sido cada vez mais compreendida como uma doença vascular na qual se associam fatores genéticos, ambientais e biológicos, ativando o endotélio, produzindo vasclusão, hemólise, estresse oxidativo, vasculopatia e comprometimento de órgãos e sistemas. Processo inflamatório mediado por citocinas é deflagrado em várias etapas da fisiopatologia, tendo por isto papel fundamental nas complicações da doença. Perfil dislipidêmico também tem sido observado na AF⁽²⁵⁻²⁷⁾ e necessita de maior conhecimento da sua relação com hemólise, inflamação e disfunção endotelial.⁽³¹⁾

Os estudos envolvendo citocinas em AF são controversos. Não demonstram um perfil definido destes mediadores no estado estável^(85,86) e durante CVO^(18,91) e poucos trabalhos foram realizados em crianças (Akoroud S⁽⁹³⁾, Sameh Sarray⁽⁹⁸⁾ e Hibbert M.Jacqueline.⁽¹⁴⁹⁾ Poucas correlações entre citocinas e marcadores clínicos e laboratoriais da doença tem sido relatado e não são específicos. Os diversos autores avaliam diferentes painéis de citocinas em suas amostras o que dificulta a generalização. Além disto, não identificamos na literatura estudos avaliando associações entre perfil lipídico e citocinas.

Akoroud⁽⁹³⁾ avaliando as IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-10 e TNF α em crianças de 9 a 15 anos de idade em estado estável da doença só observou elevação da IL-8. Sarray et al⁽⁹⁸⁾ avaliando IL-6, IL-10 e TNF α em uma população pediátrica composta por 147 pacientes em CVO e 63 sem crise de dor durante 9 meses observou níveis de IL-10 mais baixos durante CVO, enquanto as citocinas IL-6 e TNF- α foram mais elevadas. Em adultos com Doença Falciforme em estado estacionário, Pathare (2004)⁽¹⁸⁾ demonstrou elevação das IL-1 β , IL-6 e IFN-g e elevação de IL-6, TNF- α durante episódios vasclusivos. Lanaro et al⁽⁹⁴⁾ em 2009 observaram níveis elevados de IL-8 em indivíduos com AF em estado estável da doença. Carvalho et al⁽¹⁵⁰⁾ avaliando 109 pacientes estáveis com AF e 23 em crise vasclusiva concluiu que as IL- 1 β , IL-6 e TNF- α podem ser preditoras de crise aguda. As IL-6, IL-8 e TNF α são as citocinas que mais se apresentam elevadas em episódios dolorosos agudos^(18,97,90) e no estado estável da doença.^(81,86,89,96) Alguns autores como Vicari et al⁽⁹³⁾ e Graido-Gonzalez et al⁹¹ não observaram elevação das IL-6, IL-1 β , IL-8 e

TNF- α em pacientes com AF em estado estável, quando comparados a controles, como também durante e após crises vasclusivas.

Neste estudo, a análise de cluster demonstrou elevação das citocinas testadas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, TNF- α) no grupo AF, com predomínio entre aqueles tratados com HDX. Apenas a IL-12p70 foi mais elevada no grupo não tratado com HDX e a IL-10 foi mais elevada no grupo controle. O tamanho da amostra e a grande amplitude desta variável pode ter limitado a demonstração desta diferença através da análise bivariada e por isto foi optado a análise multivariada de cluster.

A adesão da hemácia falcizada ao endotélio estimula a produção das IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α através da ativação de macrófagos e monócitos. Vasclusão e isquemia tecidual promovem liberação de IL-6 e TNF- α aumentando a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado.⁽¹⁵¹⁾ No estado estacionário da AF, provavelmente microinfartos subclínicos, justificam o aumento de citocinas.⁽¹⁸⁾

Foi observado correlação positiva entre TNF α e número total de transfusões sanguíneas, variável relacionada a fenótipo de maior gravidade. IL-17A e IL-8 apresentaram correlação positiva com número de CVO no último ano e CVO com necessidade de atendimento em unidade de emergência médica. A IL-8 é sintetizada por macrófago, tem ação quimiotática para neutrófilos e linfócitos T; estimula a inflamação e aumenta a expressão de moléculas de adesão (V-CAM e I-CAM), mecanismos que estão envolvidos com a vasclusão. A IL-17 estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, sobretudo a IL-8. Keikhaei et al ⁽¹⁵²⁾ sugeriram que estas IL podem ser usadas como marcadores de severidade de doença. Gonçalves et al⁽⁹¹⁾, avaliando IL-8 em pacientes com AF, sendo 23 pacientes com DF assintomáticos, 22 pacientes em crise vasclusiva produzindo priapismo, crise de dor abdominal e crise musculo-esquelética e 11 sujeitos saudáveis, com faixa etária de 1 a 45 anos observou elevação significativa de IL-8 durante CVO, sugerindo a sua utilização como marcador desta manifestação aguda da AF. Sugere, ainda, que níveis de IL-8 devam ser monitorados no estado estável para definir os valores indicativos de risco de CVO.

Avaliando o perfil lipídico dos pacientes com AF, foi observado níveis de colesterol total, HDL-c e LDL-c mais baixos; níveis de TG/HDL-c e triglicérides mais elevados, quando comparado a controles saudáveis. Estes achados foram descritos por outros autores avaliando adultos e crianças de etnias e regiões geográficas

diferentes^(25,26,27). O colesterol é um dos principais componentes da membrana celular, representando 40% da sua constituição⁽³¹⁾. LDL-c é a lipoproteína com maior conteúdo de colesterol e a principal responsável pelo suprimento desse metabólito às células. Receptores de LDL-c estão mais ativados nos tecidos onde o colesterol é mais requisitado e o tecido hematopoiético é um deles.⁽³¹⁾ Baixos níveis de colesterol plasmáticos foram relatados em diversos tipos de anemias adquiridas e hereditárias, como anemia megaloblástica, ferropriva, esferocitose hereditária, anemia falciforme e talassemias.⁽³¹⁾ Os principais mecanismos relacionados a hipocolesterolemia seriam: a) o consumo do colesterol para a síntese de hemácias em razão da hemólise aumentada; b) diluição do colesterol sérico em virtude da diminuição da massa eritrocitária e aumento do conteúdo plasmático; c) estresse oxidativo favorecendo a oxidação do LDL-C e aumentando a remoção desta lipoproteína da circulação.⁽²⁶⁾ A hemólise libera espécies reativas de oxigênio e a terapia transfusional leva a sobrecarga de ferro, tornando o LDL-c mais susceptível a oxidação e remoção.

Alguns estudos em AF, demonstraram diminuição da apo A-1 e da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) e aumento do conteúdo de triglicérides em todas as lipoproteínas.⁽¹⁵³⁾ A apo A-1 é o maior componente do HDL-c, atua como cofator para a enzima lecitina colesterol acetil transferase (LCAT), enzima que converte o colesterol em ésteres de colesterol na superfície do HDL-c, fundamental para o processo do transporte reverso do colesterol para o fígado.⁽¹⁵⁴⁾ A disfunção hepática que habitualmente está presente na AF reduz a produção endógena de colesterol e aumenta a produção de triglicérides. Estas alterações se relacionam ao aumento de triglicérides, diminuição do HDL-c e do colesterol total observado na AF.

Correlações entre perfil lipídico e inflamação foi demonstrado neste estudo através de correlação positiva entre colesterol e PCR-as, TG/HDL-C e leucócitos. Leucócito é fator independente para maior severidade de doença. Associa-se a AVE, morte precoce na infância e na vida adulta; infarto silencioso; CVO frequente; STA recorrente; priapismo e nefropatia.^(19,21,106) PCR-as é um marcador de inflamação sistêmica que na AF foi associado a dor por CVO.⁽²²⁾ Leucócitos ativados produzem espécies reativas de oxigênio que comprometem o metabolismo lipídico. Seixas et al⁽²⁷⁾ avaliando associações entre perfil lipídico e marcadores fisiopatogênicos da doença falciforme, em amostra constituída por 152 crianças, observou correlação negativado HDL-c com leucócitos, monócitos e plaquetas.

Estudos realizados em doenças inflamatórias e infecciosas⁽³²⁾ demonstraram que TNF α , IL-1, IL-2, IL-6, aumentam os níveis séricos de triglicérides e VLDL. A inflamação promove lipólise tecidual, aumento da oferta de ácidos graxos livres para o fígado, aumentando a síntese de triglicérides. Há relato que em algumas doenças inflamatórias ocorre diminuição da atividade da lipase lipoprotéica sintetizada por células endoteliais, reduzindo a lipólise do TG transportado por quilomícrons e pela lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Apesar da Doença Falciforme apresentar estado inflamatório crônico e perfil dislipidêmico e estes mecanismos se encontrarem associados em patologias como na obesidade, doença cardiovascular e doença auto-imune, neste estudo não foi observado correlação entre citocinas e perfil lipídico.

A razão TG / HDL-c foi positivamente correlacionada a LDH e negativamente correlacionado a hemoglobina em indivíduos com AF. Na análise de cluster a razão TG/HDL-c foi mais elevada no grupo não tratado com HDX, onde predominou hemólise. Falcêmicos que evoluem com predomínio de hemólise apresentam mais hipertensão pulmonar, priapismo, acidente vascular cerebral e úlceras de perna, complicações crônicas relacionadas a vasculopatia.⁽²⁴⁾ Triglicérides elevado na AF é fator independente para Hipertensão pulmonar e a razão TG/HDL-c apresentou correlação negativa com dilatação mediada por fluxo em estudo realizado por Zorca et al.⁽¹¹⁸⁾ No estudo realizado por Seixas et al⁽²⁷⁾ foi observado correlações negativa entre HDL-c e reticulócitos, LDH, bilirrubina indireta e TGO, correlação negativa entre TG e Hb, correlação positiva entre HDL-c e Hb, demonstrando a associação entre metabolismo lipídico e hemólise.

Observado neste estudo correlação positiva entre a razão TG/HDL-c e velocidade do fluxo sanguíneo nas artérias cerebrais direita e esquerda pelo Doppler transcraniano. A velocidade do fluxo sanguíneo medida pelo Doppler transcraniano é um importante preditor de AVE, quando apresenta velocidade de fluxo acima de 200 cm/s⁽¹⁵⁵⁾. O AVE é uma das principais causas de morbidade e mortalidade na AF, afetando principalmente crianças menores de 10 anos, com taxas de ocorrência de 1,02 / 100 em pacientes com idade entre 2 e 5 anos e 0,79 / 100 entre 6 e 10 anos de idade⁽¹⁵⁶⁾. Nesse contexto, a relação TG / HDL-c surge como um potencial marcador de lesão vascular encefálica e possivelmente deve ser incluída na avaliação de rotina desses pacientes, a fim de proporcionar intervenções terapêuticas precoces.

STA e CVO predominaram em pacientes com razão TG / HDL-c acima do valor de corte (2,73 mg/dl). STA é a segunda causa de internação em pacientes com mais de dois anos de idade, é a principal causa de internação em unidades de terapia intensiva e a principal causa de mortalidade na AF^(108,157). Episódios recorrentes de dor estão associados à mortalidade precoce em pacientes com mais de 20 anos de idade. Três ou mais episódios de CVO requerendo cuidados médicos hospitalares é um critério para o uso de hidroxiureia. Neste estudo, indivíduos com TG/HDL-c acima de 2,73 mg/dl apresentaram uma RP de 1,64 IC 95% (1,09-2,64) e razão de chance de 3,77, IC 95% (1,135-12,53) para episódios de STA. Houve maior frequência de CVO 64% vs 36% (P=0,057). A razão TG/HDL-c é um marcador de lesão vascular em doenças cardiovasculares^(29,30) e na AF as correlações com hemólise, níveis de leucócitos, alterações no doppler transcraniano e com episódios de STA, sugerem um papel deste marcador na agressão vascular.

A análise de Cluster permitiu a identificação de três subfenótipos: hemolítico, inflamatório e saudável. O sub-fenótipo inflamatório foi formado pelo grupo em tratamento com HDX. Além da elevação de citocinas, este grupo apresentou elevação de PCR-as e do número total de leucócitos., caracterizando um estado inflamatório crônico. Este grupo recebeu maior número de transfusões sanguíneas ao longo da vida, sugerindo uma evolução mais grave.

No grupo não tratado com HDX houve predomínio dos marcadores de hemólise (LDH, reticulócitos, BI, TGO), níveis de hemoglobina mais baixos e elevação da razão TG/HDL-c. Este grupo apresentou níveis de LDH, significativamente mais elevados quando comparados ao grupo em tratamento com HDX.

Do nosso conhecimento a descrição destes subfenótipos associados ao tratamento ou não com HDX ainda não haviam sido descritos.

A literatura tem demonstrado a capacidade da HDX reduzir a hemólise ao aumentar a concentração intraeritrocitária de HbF e diminuir a polimerização.^(120,121) Este mecanismo pode justificar a redução de hemólise observada em pacientes tratados com HDX. No Brasil e em Salvador-BA predominam haplótipos do gene β^s que cursam com concentrações mais baixa de HbF (Benin e Bantu), um reconhecido modulador da polimerização da HbS.^(47,48) Por outro lado, o aumento de citocinas no grupo tratado com HDX, poderia sugerir efeito pró-inflamatório desta medicação, entretanto alguns estudos, tem demonstrado uma possível ação antiinflamatória

desta medicação ao reduzir a contagem de neutrófilos, reduzir a expressão de moléculas de adesão na superfície eritrocitária⁽¹⁵⁸⁾ como também reduzir a expressão da E-selectina, P-selectina, ICAM (intercellular adhesion molecules), PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) e VCAM-1 (vascular cell adhesion protein 1). Recente estudo longitudinal realizado por Penkert Rhiannon et al (2017)⁽¹⁵⁹⁾ envolvendo crianças HbSS e HbS β thalassemia, demonstrou que a terapia com HDX reduziu o nível de moléculas inflamatórias de forma mais eficiente que a terapia com transfusões sanguíneas quando comparados a controles saudáveis, mas não totalmente, o que justifica pesquisa de outras drogas a serem utilizadas associadas a HDX. Os marcadores que apresentaram redução significativa com o uso contínuo de HDX por um período de 2 anos foram IFN α 2, VCAM-1, CD40L, EGF, E-selectina, IL-7, MIP-1 α e MIP-1 β , citocinas que não foram testadas em nosso estudo.

Alguns trabalhos apresentam resultados contraditórios em relação a níveis de interleucinas e tratamento com HDX. Keikhaei et al (2013)⁽¹⁵²⁾ relataram que pacientes que receberam hidroxiureia exibiram níveis aumentados de IL-6 em comparação com pacientes não tratados enquanto Saleh et al (1998)⁽¹⁶⁰⁾ relataram uma diminuição dos níveis de IL-6 em doentes após iniciar a terapêutica com hidroxiureia embora tenha testado um número reduzido de pacientes. É possível que o grupo tratado com HDX represente um grupo com evolução mais grave, apresentando por isto mais inflamação que o grupo não tratado. O desconhecimento dos níveis de citocinas antes da introdução da HDX, em razão do caráter do estudo de corte transversal, dificulta a análise do impacto desta droga sobre a inflamação.

9 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Este estudo permitiu avaliar correlações entre marcadores moleculares envolvidos na fisiopatologia da AF e manifestações clínicas da doença, selecionando aqueles que se associam a evolução clínica de maior gravidade. Permitiu analisar o comportamento destes marcadores em 3 grupos: AF em tratamento com HDX, AF não tratados com HDX e grupo saudável. A amostra estudada foi formada por crianças e adolescentes, faixa etária importante para a identificação de agressão vascular precoce e de fenótipos graves que se beneficiarão com terapias mais definitivas, como o transplante de células hematopoiéticas antes que lesões permanentes se estabeleçam. As limitações envolvidas no estudo foram:

- 1) O tamanho amostral pode ter sido um fator limitante para demonstrar diferença dos níveis de citocinas entre os grupos AF e saudáveis através da análise bivariada, em vista da distribuição não normal desta variável e grande desvio-padrão, por isto o modelo de cluster foi uma alternativa para avaliar variáveis com estas características.
- 2) O modelo do estudo de corte transversal apresentou limitações para analisar a influência da HDX no perfil de citocinas, porque o nível de citocinas antes da introdução do tratamento não era conhecido. As informações sobre adesão ao tratamento não estavam disponíveis no prontuário, porém o aumento do VGM em falcêmicos tratados com HDX demonstra o benefício do uso desta droga,
- 3) O Doppler transcraniano foi realizado por dois operadores que trabalhavam nas respectivas instituições de recrutamento de dados, seguindo seus protocolos de avaliação, o que pode determinar algum grau de variação Inter observadores.
- 4) A definição de STA ainda não está bem estabelecida nas unidades de atendimento emergencial e de internamento pediátrico e por isto este dado pode ter sido subestimado. Embora possa ter havido menor sensibilidade no diagnóstico o critério de definição utilizado garantiu uma boa especificidade.

Estudos com metabólômica serão realizados e avaliação da arginase e do estresse oxidativo já foram realizados, encontrando-se em fase de análise de dados.

Estas análises permitirão um aprofundamento nas interrelações moleculares na AF e maior compreensão dos mecanismos que envolvem a agressão vascular precoce.

10 CONCLUSÕES

- 1) Crianças e adolescentes com AF em estado estável, apresentaram estado inflamatório crônico que predominou no grupo em tratamento com HDX, potencialmente mais graves.
- 2) As citocinas se correlacionaram com maior número de CVO e transfusões sanguíneas, demonstrando o seu papel na patogênese da AF.
- 3) Crianças e adolescentes com AF não tratados com HDX apresentaram perfil hemolítico associado a aumento de TG/HDL, demonstrando a associação entre perfil lipídico e hemólise.
- 4) A razão TG/HDL desponta como um marcador de eventos vasculares dado as correlações apresentadas com LDH, número de leucócitos, velocidade de fluxo da artéria cerebral e associação com STA.

REFERÊNCIAS

1. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 762–769.
2. Bain BJ. Haemoglobinopathy diagnosis. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2ª ed. 2006. <https://doi.org/10.1002/9780470988787>
3. Serjeant GR. Sickle Cell Disease. *The Lancet*. 1997; 350: 725-730. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07330-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07330-3)
4. Steinberg MH; Nagel RL. Sickle cell disease. In: Steinberg MH; Forfet BG; Higgs DR; Nagel RL, (Ed). *Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management*. New York: Cambridge University press, 2001; 489-49
5. Brasil. Ministério da Saúde. Hemoglobinopatias: Doença falciforme. Brasília, 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27777&janela=1>. Acesso em: 12 maio 2017.
6. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *The Lancet* 2012; 381(9861): 142-15. [Doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61229-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61229-X)
7. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, et al. Mortality in sickle cell disease: life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*. 1994;330(23):1639-1644
8. Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(3):203-6.
9. Silva MDM, Bouzas LFS, Filgueira, A L. Manifestações tegumentares da doença enxerto contra hospedeiro em pacientes transplantados de medula óssea. *An. bras. Dermatol*. 2005; 80(1): 69-80.
10. Steinberg MH. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *Trends Pharmacology Sci*. 2006; 27:204-10.
11. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2004; 364:1343-60.
12. Kaul DK, Nagel RL. Sickle cell vasoocclusion: many issues and some answers. *Experientia*. 1993; 49: 5-15
13. Wood KC, Hebbel RP, Granger DN. Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice. *Faseb J* 2005; 19: 989–91.
14. Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion: Multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol* 2002; 9: 101–06.

[doi:10.1097/00062752-200203000-00003](https://doi.org/10.1097/00062752-200203000-00003)

15. Belcher JD, Bryant CJ, Nguyen J, et al. Transgenic sickle mice have vascular inflammation. *Blood* 2003; 101: 3953–59.
16. Belcher JD, Mahaseth H, Welch TE, et al. Critical role of endothelial cell activation in hypoxia-induced vasoocclusion in transgenic sickle mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H2715–25.
17. Francis RB Jr, Haywood LJ. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc.* 1992; 84: 611-615
18. Pathare A, Kindi S.A, Alnaqdy AA, *et al.* Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Am J Haematol.* 2004; 77:323-328
19. Miller ST, Sleeper LA, Pegelow, CH, Enos LE, Wang WC, Weiner SJ,, Wethers DL, Smith J, Kinney TR. Prediction of Adverse Outcomes in Children with Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 2000; 342:83-89 DOI: 10.1056/NEJM200001133420203.
20. Balkaran B, Char G, Morris JS, Thomas PW, Serjeant BE, Serjeant GR. Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. *J Pediatr* 1992; 120:360-366
21. Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2005; 129:465-81
22. Suba Krishnan, Yamaja Setty, Suhita G. Betal, Vaidyula Vijender, Koneti Rao, Carlton Dampier, Marie Stuart. Increased levels of the inflammatory biomarker C-reactive protein at baseline are associated with childhood sickle cell vasocclusive crises. *British Journal of Haematology.* 2010; 148: 797–804 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.08013.x>.
23. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, III Schechter AN, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nature Medicine.* 2002;8:1383–1389.
24. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev.* 2007;21:37-47.
25. Shores J, Peterson J, Vander Jagt D, Glew RH. Reduced cholesterol levels in African-American adults with sickle cell disease; *J Natl Med Assoc,* 2003; 95(9): 813-817. PMID: [14527048](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14527048/).
26. Erasmus RT, Olukoga O, Ojuawo O. Plasma lipids and lipoproteins in Nigerian children with sickle cell anaemia. *Ann Trop Paed.* 1990; 10:421-423 <https://doi.org/10.1080/02724936.1990.11747468>

27. Seixas MO, Rocha LC, Carvalho MB, Menezes JF, Lyra IM, Nascimento V M, Gonçalves MS. Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease. *Lipids in Health and Disease*. 2010; 9: 91. <http://doi.org/10.1186/1476-511X-9-91> PMID: [20799970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20799970/)
28. Vieira EA, Carvalho WA, Aras R Jr, Couto FD, Couto RD. Razão triglicérides/HDL-C e proteína C reativa de alta sensibilidade na avaliação do risco cardiovascular. *J Bras Patol Med Lab* . 2011;47(2):113-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442011000200004>.
29. Hanak V, Munoz J, Teague J, Stanley A Jr, Bittner V. (2004) Accuracy of the triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio for prediction of the lowdensity lipoprotein phenotype B. *Am J Cardiol* . 94(2):219-22. DOI: [10.1016/j.amjcard.2004.03.069](https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.03.069) PMID: 15246907.
30. Da Luz PL, Favarato D, Faria-Neto JR Jr, Lemos P, Chagas AC.(2008) High ratio of triglycerides to HDL-cholesterol predicts extensive coronary disease. *Clinics* . 2008;63(4):427-32 doi: [10.1590/S1807-59322008000400003](https://doi.org/10.1590/S1807-59322008000400003) PMID: [18719750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18719750/).
31. Naoum A F. Alterations of the lipid profile in anemia. *Rev.bras.hematol.hemoter*. 2005; 27(3):223-226 <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842005000300018>.
32. Khovidhunkit, W., et al., Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res*, 2004. 45(7): 1169-96.
33. Elizabeth A Price. Stanley, L Schrier. Hemoglobinopatias e anemias hemolíticas –http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicina/5175/hemoglobinopatias_e_anemias_hemoliticas_%E2%80%93_elizabeth_a_price_stanley_l_schrier.htm Última revisão: 23/10/2012.
34. Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J. Clin. Invest*. 2007; 117(4):850-858.
35. Migliaccio AR, Papayannopoulou T. Erythropoiesis. In: Steinberg MH; Forget BG; Higgs DR; Nagel RL. (Ed). *Disorders of hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management*. Nova Iorque: Cambridge University Press, 2001; 52-71.
36. Weatherall DJ. Beginnings:the molecular pathology of hemoglobin. In Provan D; Gibben, J.(Ed.). *Molecular Hematology*. 2ªed. SI: Blackwell Publishing, 2005; 1-17.
37. Galiza Neto GC, Pitombeira MS. Aspectos moleculares da Anemia Falciforme. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. Rio de Janeiro. 2003; 39(1).
38. Herrick, JB. Glóbulos vermelhos peculiares alongados e em forma de foice em um caso de anemia grave. *Arch Int Med*. 1910; 20:586-98.

39. Azevedo ES. Comentários sobre a Descoberta do Mecanismo da Anemia Falciforme. Disponível em: In: Brasil; Ministério da Saúde; Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. Doença Falciforme, Atenção e Cuidado: A experiência brasileira de 2005-2010. Brasília-DF 1ª edição. 2014. Disponível em: www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/view/1100/1056. Acesso em 31 de maio de 2018.
40. Ballas SK, Mohandas N. Pathophysiology of vaso-occlusion. Hematology/Oncology. Clinics of North America. 1996; 10(6).
41. Zago MA, Pinto ACS. The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. Rev. bras. hematol. hemoter. 2007; 29(3):207-14.
42. Powars DR. β^s gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 1991;5(3):475-493.
43. Zago MA, Silva Júnior WA; Dalle B; Gualandro S; Hutz MH; Lapoumeroulie C; Tavella MH; Araújo AG; Krieger JE; Elion J; Krishnamoorthy R. Atypical β^s haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. Am. J. Hematol. 2000; 63:79-84. 2000.
44. Nagel RL. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. Einstein Quarterly Journal of Biology and Medicine. 1984; 2: 53-62.
45. Hebbel RP. Pathobiology of sickle cell disease. In: Hoffmann R; Júnior Benz E.J; Shattil SJ; Furie B; Cohen HJ; Silberstein LE; McIave P. Hematology: basic principles and practice. 4 ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005; 591-604.
46. Zago MA, Figueiredo MS, Ogo SH. Bantu beta-S cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. Am J Phys Anthropol. 1992; 88(3):295-8.
47. Adorno EV, Zanette A, Lyra I, Seixas MO, Reis MG, Gonçalves MS. Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in northeast of Brazil. Genet Mol Biol. 2008;31(3):621-5.
48. Silva WS, Klautau-Guimarães MN, Grisolia CK. Beta-globin haplotypes in normal and hemoglobinopathic individuals from Reconcavo Baiano, State of Bahia, Brazil. Genet Mol Biol. 2010;33(3):411-7.
49. Gonçalves M.S. et al. β^s -Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. Braz J Med Biol Res. 2003; 36(10):1283-1288. ISSN 0100-879X. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2003001000001>.
50. Armando Rojas Rubio. NO a la disfuncion endotelial... Algo mas que uma negacion. Escuela de Medicina, Universidad Católica del Maule. Disponível em: <http://slideplayer.es/slide/3230466/>.

51. Altschul R. Endothelium. The Macmillan Company, New York. 1995. Book Review. Vol 1. VIII. <https://doi.org/10.1002/ar.1091220111>.
52. Kummur Abbas e Fausto Michell. Robbins Basic Pathology. Ed Saunders/Elsevier. 8ª ed. 2007.
53. Gladwin MT, Vichinsky E. Pulmonary complications of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2008;359(21):2254-65.
54. Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med*. 2008 15;44(8):1506-28.
55. Furchgott RF e Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980; 27;288(5789):373-6. PMID:6253831.
56. Barreiros ALBS, David JM. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. *Quim Nova*. 2006;29(1):113-23.
57. Chan A, Chow C, Chiu D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999;222(3):274-82.
58. Hebbel RP. Auto-oxidation and a membrane-associated 'Fenton reagent': a possible explanation for development of membrane lesions in sickle erythrocytes. *Clinics in Haematology*. 1985;14:129–140.
59. Repka T, Hebbel RP. Hydroxyl radical formation by sickle erythrocyte membranes: role of pathologic iron deposits and cytoplasmic reducing agents. *Blood*. 1991;78:2753–2758.
60. Belhassen L, Pelle G, Sediame S, Bachir D, Carville C, Bucherer C, Lacombe C, Galacteros F, Adnot S. Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation. *Blood*. 2001;97:1584–1589.
61. Okpala I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease - a red cell disorder, *Blood Rev*. 2004 Mar;18(1):65-73 [https://doi.org/10.1016/S0268-960X\(03\)00037-7](https://doi.org/10.1016/S0268-960X(03)00037-7).
62. Eisenberg S, Levy RI. Lipoprotein metabolism. *Adv Lipid Res* 1984; 25:1.017-1.058.
63. Beisiegel U. Lipoprotein metabolism. *Eur Heart J*. 1998; 19 (Suppl A): S20- 23.
64. Havel RJ. The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J Lip Res* 1984; 25:1.570-1.575.
65. Westerman MP. Hypocholesterolemia and anemia. *Br J Haematol* 1975; 31:87-94.

66. Frank PG, Marcel YL. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res.* 2000; 41: 853-72.
67. Packard CJ, Shepherd J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 3542-56.
68. Walldius G, Jungner I. The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy – a review of the evidence. *J Intern Med.* 2006; 259: 493-519.
69. Teixeira MB. Membrana Plasmática. Modelo em mosaico fluido de Singer e Nicolson. <https://pt.slideshare.net/margaridabt/membrana-plasmtica-7205208>.
70. Glueck CJ, Kelley W, Gupta A, Fontaine RN, Wang P, Gartside OS. Prospective 10 year evaluation of hypobetalipoproteinemia in a cohort of 772 firefighters and cross-sectional evaluation of Hypocholesterolemia in 1479 men in the National Health and Nutrition examination survey. *Metabolism* 1997; 46: 625-633.
71. Muldoon MF, Kritghevsky SB, Evans RW, Kagan VE. Serum total antioxidant activity in relative hypo and hypercholesterolemia, *Free Radic. Res.* 1996; 25: 239-245.
72. Maioli M, Vigna GB, Tonolo G. Plasma lipoprotein composition, apolipoprotein(a) concentration and isoforms in α -thalassemia. *Atherosclerosis* 1997; 131:127-133.
73. Belcher JD, Marker PH, Geiger P et al. Low-density lipoprotein susceptibility to oxidation and cytotoxicity to endothelium in sickle cell anemia. *J Lab Clin Med* 1999; 133:605-612.
74. Tesoriere L, D'Arpa D, Maggio A et al. Oxidation resistance of LDL is correlated with vitamin E status in α -thalassemia intermedia. *Atherosclerosis.* 1998; 137:429-435.
75. Vitols S, Björkholm M, Gahrton C et al. Hypo-cholesterolaemia in malignancy due to elevated low-density-lipoprotein-receptor activity in tumor cells: evidence from studies in patients with leukemia. *Lancet* 1985; 2:1.150-1.154.
76. Henriksson P, Ericsson S, Stege R et al. Hypocholesterolaemia and increased elimination of low density lipoproteins in metastatic cancer of the prostate. *Lancet* 1989; 2:1.178-1.180.
77. Naoum PC. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2001; 23 (2):111-119. ISSN 1516-8484. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842001000200010>.
78. Dinarello CA; Mier JW. Interleukins. *Annual Review of Medicine.* 1986; 37:173-8. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.me.37.020186.001133>.

79. Pitanga TN, Vilas-Boas W, Cerqueira BAV, Seixas MO, Barbosa CG, Adorno EV, Gonçalves MS. Cytokine profiles in sickle cell anemia: Pathways to be unraveled. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2013; 4:6-12
<http://dx.doi.org/10.4236/abb.2013.47A1002>.
80. Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin* 2009; 33:1–16.
81. Steinberg MH, Rodgers GP. Pathophysiology of sickle cell disease: Role of cellular and genetic modifiers. *Seminars in Hematology*. 2001; 38:299-306.
[doi:10.1016/S0037-1963\(01\)90023-X](https://doi.org/10.1016/S0037-1963(01)90023-X).
82. Malave Y, Perdomo, E. Escalona, *et al.* Level of tumor necrosis factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. *Acta Haematol*. 1993; 90: 172-176.
83. Qari MH, Dier U, Mousa SA. Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012; 18:195-200.
84. Asare K, Gee BE, Stiles JK., Wilson, N.O., Driss, A., Quarshie, A., Adams, R.J., Kutlar, A. and Hibbert, J.M. Plasma interleukin-1beta concentration is associated with stroke in sickle cell disease. *Cytokine*. 2010; 49:39-44.
[doi:10.1016/j.cyto.2009.10.002](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.10.002).
85. Croziat H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state *Brit J Haematol*.1994; 87: 592-594.
86. Bourantas KL, Dalekos GN, Makis A, Chaidos A, Tsiara S, Arvides AM. Cytokines and acute-phase proteins during the steady state of sickle cell disease *Eur J Hematol*. 1998; 61:49-54.
87. De Nucci G, Thomas R, D'Orleans JP, *et al.* Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci*. 1998; 85:9797.
88. Taylor SC, Shacks SJ, Wiley P. Type 2 Cytokine serum levels in healthy sickle cell disease patients. *J. Natl. Med. Assoc*. 1997; 89(11):753-7.
89. Kuvibidila S, Gardner R, Ode D, Yu L, Lane G, Warrier RP. Type 2 cytokine serum levels in healthy sickle cell disease patients. *J Natl Med Assoc*. 1997; 89(9): 609–615.
90. Graido-Gonzalez E, Doherty JC, Bergreen EW, Organ G, Telfer M., McMillen MA. Plasma Endothelin-1, Cytokine, and Prostaglandin E2 Levels in Sickle Cell Disease and Acute Vaso-Occlusive Sickle Crisis. *Blood*. 1998; 92(7): 2551-2555.

91. Gonçalves MS, Queiroz IL, Cardoso SA, Zanetti A, Strapazoni AC, Adorno E, Albuquerque, A., Sant'Ana, A., dos Reis, M.G., Barral, A. and Barral Netto, M. Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*. 2001; 34: 1309-1313.
92. Vicari P, Noguti MAE, Morelli VM, Cançado RD, Figueiredo MS. Inflammatory Cytokines: TNF α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 in Pulmonary Hypertension of Sickle Cell Disease. *Blood*. 2007; 110:3787.
93. Akohoue AS, Shankar S, Milne GL, Morrow J, Chen KY, Ajayi WU, Buchowski MS. Energy expenditure, inflammation, and oxidative stress in steady-state adolescents with sickle cell anemia. *Pediatr Res*. 2007;61(2):233-8.
94. Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol*. 2009;85 (2):235-42.
95. Bandeira ICJ, Rocha LBS, Barbosa MC, Elias DBD, Querioz JAN, Carioca Freitas MV, Gonçalves RP. Chronic inflammatory State in sickle cell anemia patients is associated with HBB_S haplotype. *Cytokine*. 2014 ;65(2):217-21. doi: 10.1016/j.cyto.2013.10.009. Epub 2013 Nov 27.
96. Da Silva RR, Pereira MC, Melo Rêgo MJ, et al. Evaluation of Th17 related cytokines associated with clinical and laboratorial parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine*. 2014;65(2):143–147.
97. Nnodim Johnkennedy, Meludu Samuel C, Dioka CE, Martin Ifeanyichukwu, UkaibeNkiru, Ihim Augustine. Cytokine Expression in Homozygous Sickle Cell Anaemia. *JKIMSU*. 2015; 4(1).
98. Sarray S, Saleh LR, Lisa Saldanha F, Al-Habboubi HH, Mahdi N, Almawi WY. Serum IL-6, IL-10, and TNF α levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. *Cytokine*. 2015;72(1):43-7. doi: 10.1016/j.cyto.2014.11.030. Epub 2015 Jan 5.
99. Vilas-Boas W, Veloso Cerqueira BA, Figueiredo CV, Santiago RP, da Guarda CC, Pitanga TN, Santana SS, Dias Zanette AM, Gonçalves MdeS. Association of Homocysteine and inflammatory-related molecules in sickle cell anemia. *Hematology*. 2016; 21(2): 126-31.
100. Kaul DK, Finnegan E, Barabino GA. Sickle red cell endothelium interactions. *Microcirculation*. 2009;16(1):97–111.
101. Manwani D, Frenette PS. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. *Blood*. 2013;122(24):3892–898. doi: 10.1182/blood-2013-05-498311PMCID: PMC3854110 PMID: 24052549.

102. Switzer JA, David C Hess, Fenwick T Nichols, Robert J Adams. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. *The Lancet Neurology*. Volume 5, No. 6, p501–512, June 2006. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70469-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70469-0).
103. Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: an overview of molecular etiology, pathophysiology and therapeutic approaches. *Scientific World Journal* . 2008; 8:1295-324.
104. Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *Scientific World Journal*. 2009; 18;9:46-67.
105. Ballas SK. Defining the Phenotypes of Sickle Cell Disease. *Hemoglobin*. 2011; 35: 5-6.
106. Leikin SL, Gallagher D, Kinney TR, Sloane D, Klug P, Rida W. Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. *Pediatrics* 1989;84:500-508.
107. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* 1998; 91:288-29.
108. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. *Blood* 1994;84:643-649.
109. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E et al. Pain in sickle cell disease: rates and risk factors. *N Engl J Med* 1991; 325:11-16.
110. Pearson HA, Gallagher D, Chilcote R, et al. Developmental pattern of splenic dysfunction in sickle cell disorders. *Pediatrics* 1985; 76:392-397.
111. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med*. 1995; 332(20):1317-22.
112. Teixeira RS, Terse-Ramos R, Ferreira TA, Machado VR, Perdiz MI, Lyra IM, Nascimento VL, Boa-Sorte N, Andrade BB, Ladeia AM. Associations between endothelial dysfunction and clinical and laboratory parameters in children and adolescents with sickle cell anemia. *PLoS One*. 2017; 12(9):e0184076. doi: 10.1371/journal.pone.0184076. eCollection 2017.
113. Madigan C, Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part I: sickle cell disease. *Expert Ver*. 2006; 8:1-23.
114. O'Driscoll S, Height SE, Dick MC, Rees DC. Serum lactate dehydrogenase activity as a biomarker in children with sickle cell disease. *British journal of hematology*. 2008; 140: 206-9.

115. Kato GJ, McGowan VR, Machado RF, Little JA, Taylor VJ, Morris CR, et al. Lactate dehydrogenase a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension and death in patients with sickle cell disease. *Blood*. 2006; 107:2279-85.
116. Field JJ, Macklin EA, Yan Y, Strunk RC, DeBaun MR. Sibling history of asthma is a risk factor for pain in children with sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 2008; 83:855-.
117. Hargrave DR, Wade A, Evans JP, Hewes DK, Kirkham FJ. Nocturnal oxygen saturation and painful sickle cell crises in children. *Blood*. 2003; 101:846-8.
118. Zorca S, Freema L, Hildesheim M, Allen D, Remaley T A, Taylor G J, Kato J G. (2010) Lipid levels in sickle-cell disease associated with haemolytic severity, vascular dysfunction and pulmonary hypertension. *British J Haematology*; 149(3): 436–445. DOI: [10.1111/j.1365-2141.2010.08109.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08109.x) PMID: 20230401.
119. Dressler WFC and Sterin R. Uber den Hydroxylharnstoff. *Jusutus Liebigs Ann Chem Pharm* 1869;150: 242-252. 2000;342(25): 1855-65.
120. Stevens MR. Hydroxyurea: an overview. *J Biol Regul Homeost Agents*. 1999;13(3):172-5.
121. Krakoff IH, Brown NC, Reichard P. Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. *Cancer Res*. 1968; 28(8): 1559-65.
122. Cartron J-P, Elion J. Erythroid adhesion molecules in sickle cell disease: effect of hydroxyurea. *Transfus Clin Biol*. 2008; 15:39-50.
123. Lou TF, Singh M, Mackie A, Li W, Pace BS. Hydroxyurea generates nitric oxide in human erythroid cells: mechanisms for gamma-globin gene activation. *Exp Biol Med*. 2009; 234:1374-82.
124. Steinberg MH. Management of Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*. 1999; 340(13):1021-30.
125. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde; Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme. Portaria Conjunta nº 5 de 19 de fevereiro de 2018. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/fevereiro/22/Portaria-Conjunta-PCDT-Doenca-Falciforme.fev.2018.pdf>.
126. Ferster A, Tahriri P, Vermylen C, Sturbois G, Corazza F, Fondu P, et al. Five years of experience with hydroxyurea in children and young adults with sickle cell disease. *Blood*. 2001;97(11):3628-32.
127. Vichinsky E, Hurst D, Earles A, Kleman K, Lubin B. Newborn screening for sickle cell disease: effect on mortality. *Pediatrics*. 1988;81(6):749-55.

128. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Brasil). Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. Brasília-DF. 2002.
129. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995; 91:1314-9.
130. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992; 340:1111-5.
131. Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-Mediated Vasodilation A Diagnostic Instrument or an Experimental Tool? *Chest*. 2005; 127:2254-2263.
132. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, et al. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Engl J Med* 1996; 334:150–154.
133. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, et al. Non- invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 1995; 74:247–253.
134. Järvisalo MJ, Rönnemaa T, Volanen I, et al. Brachial artery dilatation responses in healthy children and adolescents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:H87–H92.
135. Andrade ZM, Carvalhaes JTA, Taddei JAAC, Christofalo DMJ, Ajzen SA. Endothelial function of normotensive adolescents with no risk factors for arterial hypertension. *Jornal de Pediatria*. 2005; 81(5):395-9.
136. Montalembert M, Aggoun Y, Niakate A, Szezepanski I, Bonnet D. Endothelial-dependent vasodilation is impaired in children with sickle cell disease. *Haematologica*. 2007; 92:1709-10.
137. Adams R, Mckie V, Nichols F, Carl E. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N. Engl. J. Med*. 1992; 326(9):6.
138. Wang W C, Ware R E, Miller, ST *et al*. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: A multicentre, randomized, controlled trial (BABY HUG). *The Lancet*. 2011; 377 (1663-1672).
139. Heeney M. Mahoney D. The acute chest syndrome in children and adolescents with sickle cell disease. In UpToDate. 2014. Disponível em <http://www.uptodate.com>. Acesso em: 06 novembro 2017.
140. Ballas SK, Kesen MR, Goldberg MF *et al*. Beyond the Definitions of the Phenotypic Complications of Sickle Cell Disease: An Update on Management. *The Scientific World Journal*. 2012;1-55.

141. Cançado, R DL, Ângulo C, Araújo LI, et al. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxíureia na doença falciforme Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2009; 31: 361-366.
142. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arq. Bras. Cardiol. São Paulo. 2013; 101(4), supl.1.
143. Oliveira A C, Oliveira A M, Oliveira N et al. Is triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio a surrogates for insulin resistance in youth?. Health. 2013; 5:481- 485.
144. World Health Organization. Child growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age. Disponível em: http://www.who.int/childgrowth/standards/bmi_for_age/en/ Acesso em: 15 outubro 2017.
145. Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Arq. Bras Cardiol 2010; 95(1): 1-51.
146. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. J Am Coll Cardiol. 2002; 39:257-65.
147. Sampaio RR, Ladeira AM, Meneses RB *et al.* C-reactive protein does not correlate with endothelial dysfunction in women with overweight and obese. J Clin Med Res. 2013; 5(4):294-9.
148. Costa KCM, Lima JC, Almeida AC et al. Variation of the brachial artery diameter in obese children: present and future. Revista Paulista de Pediatria. 2012; 30 (3): 431-437.
149. Hibbert JM, Hsu LL, Bhatena SJ, Irune I, Sarfo B, Creary MS, Gee BE, Mohamed AI, Buchanan ID, Al-Mahmoud A, Stiles JK. Proinflammatory Cytokines and the Hypermetabolism of Children with Sickle Cell Disease. Exp. Biol. Med (Maywood) 2005;230(1):68-74.
150. Carvalho MOS, Araujo-Santos T, Reis JHO, Rocha LC, Cerqueira BAV, Luz NF, Lyra IM, Lopes VM, Barbosa CG, Fiuza LM, Santiago RP, Figueiredo CVB, da Guarda CC, Barral Neto M, Borges VM, Gonçalves MS. Inflammatory mediators in sickle cell anaemia highlight the difference between steady state and crisis in paediatric patients. Br J Haematol. 2018;182(6):933-936. doi: 10.1111/bjh.14896.
151. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. Immunol Today 1994; 15:74–80.

152. Keikhaei B, Mohseni AR, Norouzirad R, et al. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. *Eur Cytokine Netw.* 2013;24(1):45-52).
153. Ozturk OH, Can Y, Yonden Z, Motor S, Oktay G, Kaya H, Aslan M. Lipoprotein subfraction profile and HDL-associated enzymes in sickle cell disease patients. *Lipids.* 2013; 48 (12):1217-26 PMID: 24113910 <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3849-4>.
154. Jonas A. Lecithin Cholesterol Acyltransferase. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1529(1-3): 245-56 PMID:11111093 [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00153-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00153-0).
155. Kassim A, DeBaun MR. Sickle cell disease, vasculopathy, and therapeutics. *Annu. Rev. Med.* 2013; 64:451–66. DOI: [10.1146/annurev-med-120611-143127](https://doi.org/10.1146/annurev-med-120611-143127) PMID:23190149.
156. Enniful-Eghan H, Moore RH, Ichord R, Smith-Whitley K, Kwiatkowski JL. Transcranial Doppler ultrasonography and prophylactic transfusion program is effective in preventing overt stroke in children with sickle cell disease. *J. Pediatr.*2010; 157(3):479–84. DOI: [10.1016/j.jpeds.2010.03.007](https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.03.007) PMID: 20434165.
157. Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. *Blood.* 1995 ; 86(2):776-83. PMID: 7606007.
158. Ballas SK, Dover GJ, Charache S: Effect of hydroxyurea on the rheological properties of sickle erythrocytes in vivo. *Am J Hematol.* 1989; 32:104.
159. Penkert RR, Hurwitz JL, Thomas P, Rosch J, Dowdy J, Li Tang YS, and Hankins JS. Inflammatory molecule reduction with hydroxyurea therapy in children with sickle cell anemia *Haematologica* 103(2), 50-54 2017. Doi:10.3324/haematol.2017.177360.
160. Saleh AW, Duits AJ, Gerbers A, de VC, Hillen HF. Cytokines and soluble adhesion molecules in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. *Acta Haematol.*1998;100(1):26-31).

ANEXOS

ANEXO 1 - QUESTIONÁRIO PADRÃO

Nº DO PRONTUÁRIO _____

Nome _____

Data de nascimento _____ Sexo _____

Responsável _____

Endereço _____

Telefones _____

Naturalidade _____ Procedência _____

Data _____ Instituição _____

Teste do Pezinho _____ Eletroforese de HB _____

Início do acompanhamento com especialista _____

DADOS ANTROPOMÉTRICOS E DADOS VITAIS

Peso _____ Altura _____ IMC _____ escore Z _____ Classificação _____

Estágio de Tanner _____ Menarca _____

SAT _____ PA _____ FC _____ FR _____ Círcunf. Abdom _____

CRISES ÁLGICAS (no último ano - anterior à data atual)

1. Último episódio de crise algica _____
2. Tratamento utilizado _____
3. Número de crises no último ano _____
4. Uso de opióide sim _____ não _____
5. Atendimento em emergência sim _____ não _____ Número de vezes _____
6. Internamento sim _____ não _____ Número de vezes _____
7. Incapacidade para realização das atividades _____

SÍNDROME TORÁCICA AGUDA (RX com infiltrado novo e sinais ou sintomas respiratórios)

1. Último episódio _____
2. Tempo de internamento _____
3. Uso de oxigênio sim _____ não _____
4. Necessidade de Transfusão sanguínea sim _____ não _____
5. Número de crises no último ano _____

OSTEOMIELITE Sim _____ Não _____ Idade _____

TRANFUSÕES SANGUÍNEAS

1. Sim _____ Não _____ Último episódio _____
2. Número de transfusões (no último ano) _____
3. Reações transfusionais sim _____ não _____
4. Total de transfusões até o momento _____

PRIAPISMO Sim _____ Não _____

SEQUESTRO ESPLÊNICO Sim _____ Não _____ Idade _____

ESPLENECTOMIA Sim _____ Não _____ Idade _____

Dispneia aos esforços sim ___ não ___ Habituais _____ Não Habituais _____

1. Síncope sim ___ não ___
2. Enurese sim ___ não ___

DADOS LABORATORIAIS (Colocar valores de referência e data)

HB _____ HTC _____ Eritrócitos _____

VGM _____ CHCM _____ RDW _____

Global de leucócitos _____ (%N ou SEG _____ BASO _____ BT _____ EO _____ L _____

LATÍPICOS _____ Monócitos _____ Plaquetas _____ (Data _____)

RET _____ LDH _____ Colest Total _____ TGC _____

LDL _____ HDL _____ VLDL _____ TGO _____ TGP _____ BBT

_____ BD _____ BI _____ PCR _____ GLICEMIA _____

DOPPLER TRANSCRANIANO _____

Data da realização _____

MEDICAMENTOS

Usa Hidroxiuréia sim ___ não ___ Há quanto tempo? _____

Uso de antibiótico nos últimos três meses sim ___ não ___ Quais _____

LISTA DE PROBLEMAS (Colelitíase, nefropatia, alterações oftálmicas, asma, rinite alérgica etc).

O QUE PREDOMINA EM SEU QUADRO CLINICO? (CRISE VASOCLUSIVA, INFECÇÕES, PNEUMONIAS ETC).

(responsável pela coleta de dados)

(Supervisor)

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O seu filho _____ está sendo convidado a participar da pesquisa **“Avaliação das Alterações Cardiovasculares e Respiratórias em Crianças e Adolescentes com Anemia Falciforme”**. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar se esta população apresenta mais dificuldades para respirar à noite, problemas nos pulmões que favorecerão a dificuldades respiratórias na vida adulta, inflamação nos vasos sanguíneos, problemas no coração. Para isso precisamos comparar com outras crianças e adolescentes sem Anemia Falciforme. Esta pesquisa conta com a participação de Dra. Ana Marice Ladeia, coordenadora da pesquisa e cardiologista, Dra. Regina Terse Ramos, pneumologista pediátrica, Dra. Rozana Teixeira, pediatra e pesquisadora assistente, Dra. Cristina, Otorrinolaringologista e Dra. Isabel Guimarães, cardiologista pediátrica.

Seu filho realizará as seguintes avaliações: Peso, altura, medida da pressão arterial e medida na oxigenação do sangue através de um sensor colocado do dedo da mão ou do pé que fará a leitura do oxigênio no sangue que será feita no dia do atendimento do seu ambulatório. Neste dia responderá a um questionário sobre identificação (idade, local de nascimento), se tem tido crises de dor, se tomou muitas transfusões. Posteriormente será realizado um questionário que permitirá compreender melhor o ritmo sono-vigília de sua criança e avaliar se existem problemas para iniciar o sono, se tem medo, pesadelos, se ronca, se para de respirar enquanto dorme e como é o comportamento do seu filho no dia a dia. Fará uma avaliação com Otorrinolaringologista para ver se apresenta adenoide (carne no nariz), e outras deformações no nariz que possam dificultar a respiração.

Fará um exame chamado espirometria, onde soprará em um aparelho com bocal descartável. Este aparelho vai medir a força com que ele respira e se apresenta estreitamentos nos brônquios ou problemas nos pulmões. Durante o exame será dado um remédio inalatório “bombinha” que dilata o brônquio e avalia se melhora o desempenho depois deste remédio, pois algumas crianças podem ter Asma e não saber. Este remédio poderá aumentar um pouco a frequência do coração, mas costuma ser bem tolerado e esse efeito passa rapidamente. Para estudar se os vasos estão sem dilatar quando o organismo precisa, fará um exame onde precisará de 4 horas de jejum. Será colocado no braço um aparelho de medir

pressão que será insuflado por 3 a 4 minutos e depois de esvaziado, o fluxo de sangue na artéria do braço será medido com ultrassom. Esse exame não causa dor e pode causar uma leve sensação de formigamento enquanto o aparelho de pressão estiver preso no braço. Realizará um Ecocardiógrafo, que também é um exame de ultrassom para verificar o tamanho do coração e se ele está funcionando normalmente. A polissonografia, estudo do sono, será realizada em um laboratório da Universidade Federal da Bahia. A criança e o adolescente dormirão lá com seu acompanhante e um técnico, sob condições de segurança e ambiente semelhante ao seu domicílio. Neste momento responderá a algumas perguntas sobre o sono e respiração. Em nenhuma destas etapas serão utilizados sedativos. Serão coletados exames de sangue em amostra única, que precisarão de 12 horas de jejum. Serão hemograma, colesterol e triglicérides (gordura do sangue), exames que avaliam inflamação no sangue, no fígado e a taxa de renovação das células vermelhas do sangue.

Todos estes exames não terão nenhum custo para as crianças participantes e será fornecido lanche para crianças após os exames que exijam jejum superior a quatro horas.

Estamos oferecendo ao seu filho (a) uma avaliação ampla de saúde, cujos resultados estarão disponíveis e além disso estarão ajudando outras crianças a se beneficiarem de medidas futuras que esta pesquisa poderá esclarecer. Esclarecemos ainda que os responsáveis receberão cópias dos laudos de todos os exames realizados durante a pesquisa, bem como que terão assistência médica gratuita em caso de se identificar alguma patologia durante a realização desses exames.

Diante então do exposto acima, autorizo a participação do mesmo nesta pesquisa médica, ciente de que não trará malefícios para sua saúde. Entendo também que eu tenho permissão para a qualquer momento revogar o meu consentimento e retirar o paciente do estudo sem sofrer nenhuma punição ou perda de direitos. Entretanto, o paciente poderá ser solicitado a realizar exames, caso o médico que o assiste, julgue-os necessários para a sua saúde e bem estar. Minha recusa em permitir que meu filho ou tutelado participe do estudo não resultará em punições ou perda de benefícios a que ele/ela tenha direito.

Esclarecemos ainda que o Sr (a) assinará duas cópias deste documento, uma delas devendo ficar em seu poder para esclarecimentos em qualquer momento

que julgar necessário e a outra fará parte do arquivo de protocolos e documentos da pesquisa.

Assinatura do responsável pelo paciente

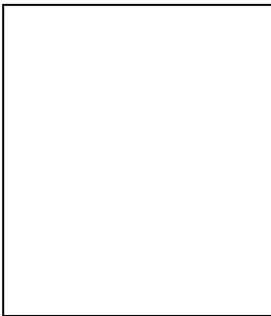
Endereço: _____

Número de identidade: _____.

Número no estudo: _____.

Salvador-BA, _____ / _____ / _____.

Paciente (menor de idade)



Impressão

Assinatura do Pesquisador Assistente

Assinatura do Pesquisador Responsável

Para maiores esclarecimentos e/ou dúvidas durante a pesquisa o senhor poderá entrar em contato com a Pesquisadora Assistente: Dra. Rozana dos Santos Teixeira, telefone (71)9204-4844 residente na Avenida Orlando Gomes, Village Piatã, Rua C, casa 12, Bairro Piatã. Salvador-BA ou Dra. Ana Marice Ladeia, telefone (071) 99642420 ou (071) 32768265, na Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, na Avenida Dom João VI, nº 275, Brotas. CEP 40.290-000.

Em caso de dúvida ou denúncia o Sr (a) poderá procurar o Comitê de Ética e Pesquisa da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, na Rua Frei Henrique nº 8, Nazaré. CEP 40.050- 420. Fone: (71) 2101-2944 / e-mail: cep@bahiana.edu.br

ANEXO 3 - TERMO DE ANUÊNCIA DA EBMSP

BAHIANA
ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

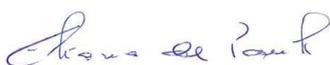
www.bahiana.edu.br

Salvador, 22 de julho de 2013

TERMO DE ANUÊNCIA

O Ambulatório Docente-Assistencial de Brotas (ADAB) da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências, sob o CNPJ 13.927.934.0001-15 concorda com a "Proposição de anuência" referente ao projeto: "AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME".

Trata-se de um pedido relevante para o desenvolvimento de nossas atividades conjuntas. Ressaltamos ainda que possuímos a infraestrutura física e de pessoal necessária à realização das atividades previstas no escopo do Projeto.



Profª Drª. Eliana de Paula

Coordenadora do Ambulatório Docente-Assistencial de Brotas (ADAB)
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

ANEXO 4 - TERMO DE ANUÊNCIA DO HOSPITAL ROBERTO SANTOS

Salvador, 22 de julho de 2013

TERMO DE ANUÊNCIA

O Hospital Geral Roberto Santos concorda com a "Proposição de anuência" referente ao projeto: "AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME".

Trata-se de um pedido relevante para o desenvolvimento de nossas atividades conjuntas. Ressaltamos ainda que possuímos a infraestrutura física e de pessoal necessária à realização das atividades previstas no escopo do Projeto.


Prof. Dr. Marcos Antônio Almeida Matos

Diretor de Ensino e Pesquisa do Hospital Geral Roberto Santos

ANEXO 5 - CARTA DE ANUÊNCIA DA FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
 Faculdade de Medicina da Bahia
DIRETORIA
 Largo do Terceiro de Jesus, s/n. Centro Histórico
 40.026-010 Salvador, Bahia, Brasil.
 Tel.: 55 71 3283.5577 | Fax: 55 71 3283.5567
 www.medicina.ufba.br | medicina@ufba.br



Salvador, 24 de julho de 2013

TERMO DE ANUÊNCIA

A Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia sob o número do CNPJ no: 15180714/0001-04 concorda com a "Proposição de anuência" referente ao projeto: "AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME".

Trata-se de um pedido relevante para o desenvolvimento de nossas atividades conjuntas. Ressaltamos ainda que possuímos a infraestrutura física e de pessoal necessária à realização das atividades previstas no escopo do Projeto, as quais serão desenvolvidas no CIUCP (Centro de Integração Universidade-Comunidade do Pelourinho), nesta Faculdade.

Cordialmente,


 Prof. Dr. Luís Fernando Fernandes Adan

Representante Legal da Instituição

Diretor, em exercício, da Faculdade de Medicina da Bahia

Universidade Federal da Bahia

Dr. Luís Fernando Fernandes Adan
 Vice-Diretor
 Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA

ANEXO 6 – CARTA DE ANUÊNCIA DO AMBULATÓRIO DOCENTE-ASSISTENCIAL DE HEMATOLOGIA PEDIÁTRICA - COMPLEXO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO PROFESSOR EDGAR SANTOS

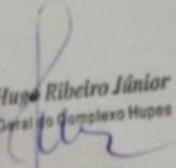
 UFBA <small>UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA</small>	Universidade Federal da Bahia Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos Rua Augusto Viana, s/, Canela, CEP:40110-060, Salvador-BA. Tel: (71) 3283-8333 E-mail: med09@ufba.br	 Complexo HUPES
--	---	--

Salvador, 25 de julho de 2013.

TERMO DE ANUÊNCIA

Pelo presente informo que o ambulatório docente-assistencial de Hematologia Pediátrica do Centro Pediátrico Professor Hosanah de Oliveira, pertencente ao Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (HUPES) da Universidade Federal da Bahia, CNPJ no: 15180714/0001-04, concorda com a "Proposição de anuência" referente ao projeto: "AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME".

Trata-se de um pedido relevante para o desenvolvimento de nossas atividades conjuntas. Ressaltamos ainda que possuímos a infraestrutura física e de pessoal necessária à realização das atividades previstas no escopo do Projeto.


Prof. Dr. Hugo da Costa Ribeiro Júnior
 Diretor Geral do Complexo Hupes

Prof. Dr. Hugo da Costa Ribeiro Júnior
 Diretor Geral do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos

1

ANEXO 7- CARTA DA ANUÊNCIA DO HEMOBA



Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia – HEMOBA

Salvador, 01 de Setembro de 2014

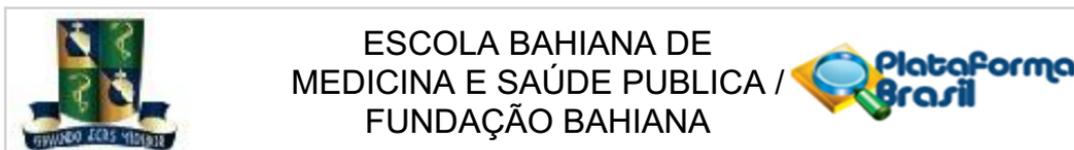
CARTA DE ANUÊNCIA

A Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia, representada pelo Diretor Geral Dr. José Raimundo Mota de Jesus, está ciente dos termos do trabalho e concorda com a realização da pesquisa intitulada: Avaliação das Alterações Cardiovasculares e Respiratórias em Crianças e Adolescentes com Anemia Falciforme desenvolvido por Rozana dos Santos Teixeira e pela professora e orientadora Ana Marice Teixeira Ladeia que faz parte de um projeto mais amplo do Curso de Pós-graduação em Medicina e Saúde Humana Coordenado por Ana Maria Teixeira Ladeia.

José Raimundo Mota de Jesus

Diretor Geral

ANEXO 8 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação das Alterações Cardiovasculares e Respiratórias em Crianças e Adolescentes com Anemia Falciforme

Pesquisador: ANA MARICE TEXEIRA LADEIA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 17663913.2.0000.5544

Instituição Proponente: Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 568.913

Data da Relatoria: 19/02/2014

Apresentação do Projeto:

Anemia Falciforme (AF) é uma das doenças hereditárias, monogênicas mais prevalentes em todo o mundo e a mais frequente no Brasil. A Bahia é o estado brasileiro com a maior incidência, com proporção de 1:650 nascidos vivos. É uma doença multissistêmica associada a episódios de adoecimento agudo e dano orgânico progressivo. Nas últimas décadas estudos experimentais e clínicos ampliaram a compreensão da fisiopatologia da AF demonstrando que repetidos fenômenos isquêmicos levam a lesão de hipóxia reperfusão, dano ao endotélio vascular e resposta inflamatória. Hoje a AF caracteriza-se por marcada disfunção endotelial, processo inflamatório crônico e hipercoagulabilidade sanguínea. Indivíduos com AF representam um grupo de risco para alterações cardiovasculares em virtude da anemia crônica e de complicações pulmonares.

Endereço: RUA FREI HENRIQUE, Nº 08.

Bairro: NAZARÉ

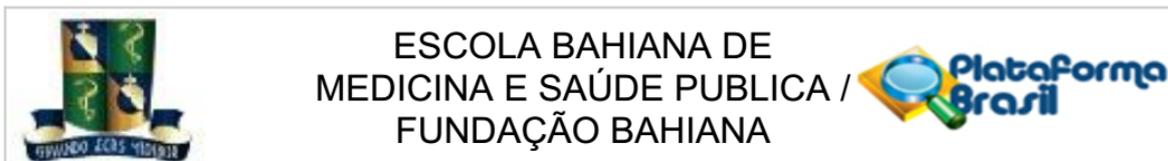
CEP: 40.050-420

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)2101-2944

E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 568.913

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

1. Demonstrar que crianças e adolescentes com Anemia Falciforme apresentam maior frequência de disfunção endotelial quando comparadas a um grupo controle sem hemoglobinopatia. 2. Demonstrar que os pacientes com Anemia Falciforme apresentam maior frequência de hipertensão pulmonar e dilatação de câmaras cardíacas 3. Demonstrar que existem outras crianças com Anemia Falciforme, quando comparado a crianças sem Anemia Falciforme 4. Demonstrar que pacientes com AF cursam com alterações respiratórias relacionadas ao sono (hipoxemia, SAOS, dessaturações) quando comparado à crianças sem AF.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar o estado nutricional das crianças e adolescentes com Anemia Falciforme e disfunção endotelial 2. Correlacionar disfunção endotelial com hemólise e vasoclusão 3. Correlacionar a avaliação da disfunção endotelial através do método de imagem (vasodilatação da artéria braquial mediada por fluxo) e dosagem de arginase e marcadores inflamatórios e reações espirométricas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa já aprovada por este CEP sendo agora solicitado pela Pesquisadora responsável a inclusão de mais um instrumento de coleta de dados. O referido instrumento irá dar mais especificidade aos objetivos já traçados, sem implicar em novos riscos ou procedimentos aos participantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequadamente apresentados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Solicitação de inclusão de questionário aprovada por não implicar em riscos ou alteração do curso da pesquisa.

Endereço: RUA FREI HENRIQUE, Nº 08.

Bairro: NAZARÉ

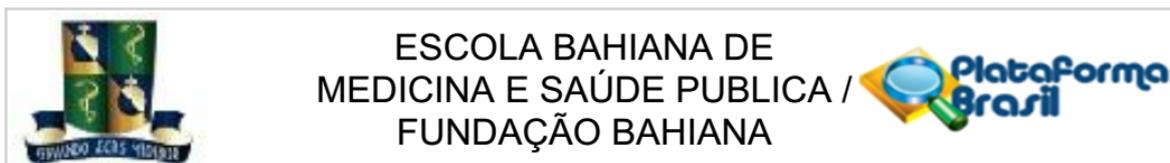
UF: BA

Município: SALVADOR

CEP: 40.050-420

Telefone: (71)2101-2944

E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 568.913

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Atenção : o não cumprimento à Res. 466/12 do CNS abaixo transcrita implicará na impossibilidade de avaliação de novos projetos deste pesquisador. Tendo sido sanadas as pendências anteriormente assinaladas e, estando de acordo com a Res. 466/12 do CNS o projeto encontra-se exequível.

XI ç DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador: a) e b) (...)

c) desenvolver o projeto conforme delineado;

d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;

e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;

f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;

g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e

h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados

SALVADOR, 26 de Março de 2014

Assinador por:
Roseny Ferreira
(Coordenador)

Endereço: RUA FREI HENRIQUE, Nº 08.

Bairro: NAZARÉ

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)2101-2944

CEP: 40.050-420

E-mail: cep@bahiana.edu.br

Anexo 9 – Artigo Submetido

Lipids in Health and Disease
Triglycerides/ HDL-Cholesterol Ratio as Potential Biomarker for Vascular Injury in
Children with Sickle Cell Anemia
 –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	Triglycerides/ HDL-Cholesterol Ratio as Potential Biomarker for Vascular Injury in Children with Sickle Cell Anemia
Article Type:	Research
Funding Information:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (EFP0006943) Dr. Ana Ladeia
Abstract:	<p>Background: Sickle cell anemia (SCA) causes substantial morbidity and mortality. The pathophysiology of this disease involves inflammation and activation of endothelial cells, promoting vascular occlusions. Dyslipidemia, a well-known risk factor for cardiovascular events, has been described in adult patients with SCA whereas is still poorly studied in pediatric populations.</p> <p>Methods: Herein, we compared the lipid profile in children and adolescents with SCA with that in age and gender-matched controls. Moreover, we tested the association between the lipid profiles and markers of hemolysis, inflammation, endothelial function and with clinical outcomes. Lastly, we examined the impact of hydroxyurea treatment on such parameters.</p> <p>Results: SCA patients exhibited lower levels of total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), while displaying higher triglyceride (TG) levels and TG/HDL-c ratio values. TG/HDL-c values were positively correlated with lactate dehydrogenase, leukocyte count, and blood flow velocity in cerebral arteries, while being negatively correlated with hemoglobin levels. Acute chest syndrome (ACS) and vaso-occlusive episodes were more frequent in SCA patients exhibiting higher TG/HDL-c values.</p> <p>Conclusions: These findings indicate that children and adolescents with SCA exhibit a lipid profile associated with hemolysis and some inflammation parameters, resulting in increased risk of vascular events. TG/HDL-c may be a potential biomarker of vascular damage in SCA.</p>
Corresponding Author:	Bruno Andrade Fundacao Oswaldo Cruz BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Fundacao Oswaldo Cruz
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Rozana Teixeira
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Rozana Teixeira Regina Terse-Ramos Paulo Silveira-Mattos Tatiane Ferreira Vinicius Machado Mara Lago

Higher Values of Triglycerides: HDL-Cholesterol Ratio - A Marked Potential for Vascular Injury in Children with Sickle Cell Anemia

Rozana S. Teixeira^{1,2*}, Regina T. T. Ramos², Tatiane A. Ferreira², Vinícius R. Machado¹, Mara R. R. Lago³, Paulo S. Silveira-Mattos^{4,5}, Ney Boa-Sorte¹, Bruno B. Andrade^{1,4,5,6*†}, Ana M. T. Ladeia^{1†}

¹*Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), Salvador, Brazil*

²*Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil*

³*Departamento de Ciências da Vida, Universidade Estadual da Bahia (UNEB), Salvador, Brazil*

⁴*Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil University of Salvador, Salvador, Bahia, Brazil*

⁵*Multinational Organization Network Sponsoring Translational and Epidemiological Research (MONSTER) Initiative, Fundação José Silveira, Salvador, Brazil*

⁶*Universidade Salvador (UNIFACS), Laureate Universities, Salvador, Brazil*

†These authors equally contributed to the work.

*Corresponding authors: bruno.andrade@bahia.fiocruz.br (BBA),
rozateixeira@bahiana.edu.br (RST)

Disclosure of Interest: We have no conflicts of interest to disclose

Acknowledgements: The authors thank the Hematology and Hemotherapy Foundation of Bahia (HEMOBA) for the critical assistance in patient recruitment and evaluation

Funding: This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) under the notice number 020/201- Research Program: shared health management – (PPSUS) of Bahia award number: EFP00006943. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Availability of the data and materials: The datasets supporting the conclusions 35 of this article are included within the article.

Abstract

Background: Sickle cell anemia (SCA) causes substantial morbidity and mortality. The pathophysiology of this disease involves inflammation and activation of endothelial cells, promoting vascular occlusions. Dyslipidemia, a well-known risk factor for cardiovascular events, has been described in adult patients with SCA whereas is still poorly studied in pediatric populations.

Methods: Herein, we compared the lipid profile in children and adolescents with SCA with that in age and gender-matched controls. Moreover, we tested the association between the lipid profiles and markers of hemolysis, inflammation, endothelial function and with clinical outcomes. Lastly, we examined the impact of hydroxyurea treatment on such parameters.

Results: SCA patients exhibited lower levels of total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), while displaying higher triglyceride (TG) levels and TG/HDL-c ratio values. TG/HDL-c values were positively correlated with lactate dehydrogenase, leukocyte count, and blood flow velocity in cerebral arteries, while being negatively correlated with hemoglobin levels. Acute chest syndrome (ACS) and vaso-occlusive episodes were more frequent in SCA patients exhibiting higher TG/HDL-c values.

Conclusions: These findings indicate that children and adolescents with SCA exhibit a lipid profile associated with hemolysis and some inflammation parameters, resulting in increased risk of vascular events. TG/HDL-c may be a potential biomarker of vascular damage in SCA.

Keywords: Sickle cell disease, lipoproteins, cholesterol, triglyceride hydroxyurea, endothelial function

Introduction

Sickle cell anemia (SCA) is an autosomal recessive and hemoglobinopathy that affects thousands of people worldwide [1]. The SCA pathophysiology is complex and involves activation of leukocytes and intricate interactions between abnormal erythrocytes and the vascular endothelium [2,3].

This association, reflects increased risk for vasculopathy with elevated levels of molecules indicative of endothelial activation, including vascular-cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), as well as leukocyte-endothelium adhesion (L-selectin) and leukocyte-platelet (P-selectin) [4].

The lipid profile seems to play an important role in SCA [5]. Patients with SCA have exhibit dyslipidemia, characterized by low levels of total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) levels and elevated triglycerides (TG) levels [6,7,8].

In some clinical settings, serum cholesterol is an important parameter for assessment of disease severity and/or progression, with lower values being usually indicative of increased risk of death [9]. In SCA these data have not yet been described. In this disease hypocholesterolemia has been associated with increased levels of biomarkers of oxidative stress [10] and increased of low-density lipoprotein susceptibility to oxidation and cytotoxicity to endothelium [11]. Assessment of TG/HDL-c ratio has been described as of useful clinical utility as its levels may serve as an important indicator of risk of cardiovascular injury [12]. Indeed, previous studies in adult patients with SCA have described a positive correlation between levels of TG and circulating concentrations of markers of hemolysis and inflammation, whereas

TG/HDL-c ratio values associate with endothelial dysfunction [5]. Of note, hypertriglyceridemia in this patient population is considered a risk factor for pulmonary hypertension [5], a leading cause of death in adults with SCA. However, a detailed role of the TG /HDL-c ratio values and associations with the occurrence of vascular events has not been reported in pediatric populations with SCA.

In this present study, we characterized the lipid profile of children and adolescents with SCA and tested its association with markers of hemolysis, inflammation, endothelial dysfunction, and clinical aspects of the disease. Furthermore, we evaluated the effect of hydroxyurea (HDU) treatment on the lipid profiles in the study population.

Methods

Study design and sample selection

This analytical cross-sectional study included children and adolescents aged between 6 and 18 years with HbSS with or without the use of hydroxyurea and age-matched healthy children. The participants were assigned to two reference centers for the treatment of hematological diseases, including the Hematology Outpatient Clinic of the Magalhães Neto Ambulatory-HUPES Complex of the UFBA Medical School, and Hematology and Hemotherapy Foundation of Bahia (HEMOBA); the healthy children and adolescents were registered in the general preventive pediatrics of Roberto Santos General Hospital (HGRS)/Bahia and School of Medicine and Public Health (EBMSP) or the Hebiatra of the Magalhães Neto Outpatient Clinic-HUPES. The study was approved by the Ethics Committee of the EBMSP, Salvador, Brazil (protocol number **568.913/2014**). All participants agreed to participate after

signing the informed consent form, per the resolution 466 of the National Health Council (BRASIL 2012). All institutions participating in the study authorized data collection. All clinical investigations were conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each participant or legal guardian at the study enrollment.

Inclusion and exclusion criteria

Individuals with SCA aged between 6 and 18 years, with HbSS diagnosed by Hb electrophoresis and/or high-performance liquid chromatography; without acute complications related to the disease or infectious conditions 1 month before inclusion; without chronic diseases; non-SCA (HbAA); with BMI for age below +2 of the z-score according to the 2007 World Health Organization (WHO) charts [13] were enrolled in the study. Individuals with SCA were excluded if they had cerebrovascular incident or blood transfusion 3 months before the study. The exclusion criteria for the control group included acute infectious conditions, dyslipidemia, and obesity.

The demographic and clinical parameters were evaluated through a standardized survey and medical records. The physical examinations included anthropometric measurements, vital signs, and peripheral oxygen saturation data.

Event definitions

Vasocclusion episodes, *VOE* [14] was described as pain symptoms warranting analgesia. *ACS* [15,16] was defined as new pulmonary infiltrate involving at least one segment of the lung, isolated atelectasis with one or more associated respiratory symptoms.

Laboratory data

Laboratory data were collected after the endothelial dysfunction test and after a fasting period of at least 8 h. The lipid profile included total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-c), low density lipoprotein cholesterol (LDL-c), and triglycerides (TG), measured by enzymatic methods and high sensitivity high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) using the turbidimetry method in a reference laboratory. The other exams were part of the outpatient examination, including the transcranial Doppler. This test is performed annually in children with SCA from 2 years of age. The study by Adams et al. defined values for blood flow velocity: up to 170 cm / s (normal); from 170 to 200cm / s (conditional); and greater than 200cm / s (critical / abnormal). [17]

Evaluation of endothelial function

According to our previously described technique to evaluate endothelial function [18], a protocol established under the guidelines for ultrasonographic evaluation of the forearm [19] was used. The examinations were performed using a VIVID 3 ultrasound scanner (GE Healthcare) 12 MHz multi-frequency transducer. The endothelium-dependent vasomotor function was assessed using flow-mediated vasodilation (FMD) and measured using reactive hyperemia.

The examinations were performed by a specially trained physician with proven experience in the technique [20]. Throughout the examination, a synchronized electrocardiogram was also obtained.

Endothelial dysfunction was defined as a flow-mediated vasodilation value below the 10th percentile of the healthy group, as described by Jarvisalo et al. and Andrade et al. [21, 22]. The dyslipidemia criteria were defined according to the V

Brazilian Directive on Dyslipidemia and Prevention of Atherosclerosis [23]. The cutoff point for the TG/HDL-c ratio was 2.73, following Oliveira et al [24].

Statistical analysis

Mean and standard deviation or median and interquartile ranges were used to characterize the dependent and independent variables depending on the nature of the variable. Student's T-tests, Spearman correlations, and chi-squared test were used to compare independent sample means, associations, and proportions, respectively. The level of 2.73 mg/dl was considered as a reference range [24] and interactions between TG/HDL-c ratio less than 2.73 mg/dl and TG/HDL-c highest than 2.73 mg/dl and baseline characteristics were evaluated using independent t-test and Mann-Whitney tests. The interactions between TG/HDL-c ratio less than 2.73 mg/dl and TG/ HDL-C ratio highest than 2.73 mg/dl and categorical clinical variables were tested for significance using a χ^2 test or Fisher's exact test, taking into account the expected frequency in the cell tables. The data analysis was performed using IBM SPSS Statistics for Windows, version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Results

Clinical characteristics of study participants

This study included 55 patients with SCA (HbSS) and 41 healthy children and adolescents (HbAA; control group). In the SCA group, 24 (43.6%) subjects referred use of hydroxyurea. SCA patients were similar to healthy individuals with regard to age (mean and standard deviation [SD] in SCA: 12.4 ± 3 years vs. 11.4 ± 3 years in control group; $p=0,123$). Frequency of male individuals was higher in the group of SCA (31 out of 55 [56.4%] vs. 14 out of 41 [34%], $p=0.031$). In addition, both

absolute and z-score normalized body mass index (BMI) values were substantially lower in the group of SCA patients compared to those in the control group (BMI absolute value in SCA; $16.7 \pm 2.3 \text{ Kg/m}^2$ vs. $18.6 \pm 3.9 \text{ Kg/m}^2$ in controls, $p = 0.011$; BMI z-score in SCA: -0.92 ± 1 vs. -0.12 ± 1.3 in controls, $p = 0.003$). Overall description of the study population is shown in Table 1.

Hematological assessment of SCA

We next compared the study groups with regard to a number of laboratory parameters. As expected, hematological evaluation revealed that patients with SCA exhibited on average lower levels of hemoglobin (Hb) compared to healthy individuals ($8.0 \pm 0.8 \text{ g/dl}$ vs $13.1 \pm 1.1 \text{ g/dL}$, respectively; $p < 0.001$). Mean corpuscular volume (MCV) values were also significantly higher in SCA patients ($91 \pm 10.8 \text{ fL}$ in SCA vs. $83 \pm 6.8 \text{ fL}$ in healthy controls; $p = 0.007$). Reticulocyte counts were elevated in SCA ($7.6 \pm 4.9\%$ in SCA vs. $0.8 \pm 0.2\%$ in healthy controls; $p < 0.001$). SCA was associated with increased platelet ($455.7 \times 10^3 \pm 139 \times 10^3 / \text{L}$ in SCA vs. $281 \times 10^3 \pm 47 \times 10^3$ in controls; $p < 0.001$) and leukocyte counts ($12.2 \pm 3.7 \times 10^3 / \text{L}$ in SCA vs. $7.2 \pm 1.5 \times 10^3 / \text{L}$ in controls; $p < 0.001$). Moreover, SCA patients exhibited significantly reduced peripheral oxygen saturation (SpO₂) compared to healthy controls ($94 \pm 3.7\%$ vs $97.7 \pm 0.9\%$, respectively; $p < 0.001$) (Table 1).

Biochemical assessment of SCA

SCA patients displayed increased levels of lactate dehydrogenase (LDH) in serum compared to healthy controls ($1184 \pm 576 \text{ U/L}$ vs. $387 \pm 33 \text{ U/L}$, respectively; $p < 0.001$). While examining biomarkers of hepatocyte stress, we observed that SCA was associated with substantially higher levels of alanine aminotransferase (ALT, 27

± 17 U/L in SCA vs. $17 \pm 8,7$ U/L in controls; $p=0.003$), aspartate transaminase (AST, 50.9 ± 22 U/L in SCA vs. 23 ± 12 U/L in controls; $p<0.001$) (Table 1). Total bilirubin as well as indirect bilirubin values were more elevated in SCA patients (total bilirubin in SCA: 3.2 ± 1.9 mg/dL vs. 0.42 ± 0.3 mg/dL in controls, $p <0.001$; indirect bilirubin in SCA: 2.6 ± 1.8 mg/dL vs. 0.33 ± 0.18 mg/dL in controls, $p <0.001$) (Table 1).

Assessment of lipid profile revealed that SCA patients exhibited increased circulating levels of triglycerides (TG) (101 ± 43 mg/dL in SCA vs. 74 ± 25 mg/dL in controls, $p <0.001$) (Table 1). Furthermore, SCA was associated with decreased values of total cholesterol (119 ± 24 mg/dL vs. 155 ± 27 mg/dL, $p <0.001$), low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol (69 ± 22 mg/dL vs. 90 ± 22.5 mg/dL, $p <0.001$), and high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol (33 ± 14 mg/dL vs. 47 ± 12 mg/dL, $p <0.001$) (Table 1). The TG/HDL-cholesterol ratio has been used as a marker that correlates with incidence and extent of coronary artery disease in both men and women [16]. In the present study, SCA patients exhibited higher values of TG/HDL-cholesterol ratio than healthy controls (3.6 ± 2 arbitrary units [AU] vs. 1.7 ± 0.8 AU, $p <0.001$) (Table 2).

In the study population, hemoglobin levels were inversely correlated with values of TG/HDL-cholesterol ratios ($r = -0.572$, $p < 0.0001$, Figure 1). SCA patients were among those with the highest values of TG/HDL-cholesterol and lowest levels of hemoglobin (Figure 1). Interestingly, when the entire population was considered, we observed a positive correlation between TG/HDL-cholesterol values and total leukocyte counts, with SCA patients simultaneously exhibiting the highest values of both parameters (Figure 2). TG/HDL-cholesterol values were also positively correlated with concentrations of LDH ($r^s 0.3$, $p = 0.047$), as well as with values of blood flow velocity in the right ($r^s 0.35$, $p = 0.037$) and left ($r^s 0.361$ $p=0.026$) cerebral

arteries examined by transcranial Doppler. Total cholesterol levels were negatively correlated with values of hs-CRP (r^s -0.3, $p = 0.04$). Levels of LDL-cholesterol were negatively correlated with the number of blood transfusions reported at the study enrollment (r^s -0.3, $p = 0.032$) (Figure 3). These findings suggest that the lipid profile in SCA likely reflects the degree of systemic inflammation and potentially impacts clinical presentation.

Assessment of endothelial dysfunction in SCA

SCA patients presented with higher values of high-sensitive C-reactive protein (CRP) (median and interquartile range [IQ] in SCA: 2.4 mg/L, 1-4 vs. 0.8 mg/L 0.2-2, $p < 0.001$), indicating augmented systemic inflammation and/or increased cardiovascular risk. Flow-mediated vasodilation (FMD) values were on average lower in the SCA patients compared to controls ($10.9\% \pm 5.9$ vs. $15.8\% \pm 8.3$, $p = 0.002$), indicating a lower endothelium-dependent vasodilator capacity.

Assessment of the flow velocity in middle cerebral artery

The median interquartile range of the flow velocity in right middle cerebral artery was 130 (112 – 148) cm/s and the flow velocity in left middle cerebral artery was 131 (109 – 156) cm/s to transcranial Doppler. The Transcranial Doppler ranking was normal 56.4% ($n=31$), conditional 10.9% ($n=6$), not normal 5.5% ($n=3$), and asymmetric 3.6% ($n=2$).

Clinical Events in SCA

Vaso-occlusive episodes (VOE) occurred in 92.7% ($n = 51$) of SCA patients, with 42 individuals demanding emergency care (76.4%) and 35 (63.6%) VOE

requiring hospitalization. Acute chest syndrome (ACS) occurred in 67.3% of the patients with SCA (n=35).

Patients with SCA and TG / HDL-c ratio above the cut-off value 2.73 mg/dl (which was the median value for the entire study population) presented higher number of ACS (n=24 [70.6%] vs. n=10 [29.4%], p=0,027), *odds ratio* 3,77, IC95%(1,135-12,53 and more VOE (n=32 [62.7%] vs. n=18 [35.3%], p= 0,057), although not statistically significant.

Impact of hydroxyurea treatment on SCA

In the group of SCA patients treated with hydroxyurea, 75% (n = 18) used this drug for less than 3 years, 58.3% (n = 14) for less than 2 years and 8.3% (n = 2) used less than six months. Treatment with hydroxyurea in SCA patients did not substantially affect levels of total cholesterol (121.5 ± 26 mg/dL in treated patients vs. 123 ± 23 mg/dL in untreated patients, p = 0.88), HDL-cholesterol (33 ± 5.7 mg/dL vs. 34.6 ± 9.4 mg/dL, p = 0.50), LDL-cholesterol (69.6 ± 23 mg/dL vs. 67 ± 24 mg/dL, p = 0.70), TG (94.5 ± 29 mg/dL vs. 104 ± 47 mg/dL, p = 0.42) and TG/HDL-c ratio (3.0 ± 1.2 mg/dL vs. 3.3 ± 1.7 mg/dL, p = 0.48). The subgroups of SCA patients undertaking or not hydroxyurea were also similar regarding hs-CRP levels (median and IQR in treated patients: 2.2 mg/L [1 - 4.6] vs. median and IQR in untreated individuals: 2 [0.87 - 3.5] mg/L, p = 0.44) and FMD values ($10.1\% \pm 5.7$ in treated patients vs. $11.6\% \pm 5.7$ in untreated patients, p = 0.32).

Discussion

Assessment of lipid profile in SCA and examination of its relationships with hemolysis, endothelial dysfunction and systemic inflammation can provide insights on

the damage vascular risk of this disease. In the present study, we found lower levels of total cholesterol, HDL-cholesterol, and LDL-cholesterol in SCA patients. In contrast, higher levels of triglycerides were observed in SCA, consistent with the findings of previous studies that included adults and children with SCA [6, 7, 8]. Our study expands the current knowledge in this field while demonstrates previously unappreciated relationships between circulating lipids and markers of endothelial dysfunction and vascular events in SCA.

Cholesterol plays an important role in cellular metabolism, including cell membrane synthesis; membranes are comprised of 52% proteins, 40% phospholipids and cholesterol, and 8% carbohydrates [25]. Low plasma levels of cholesterol have been reported in several types of acquired and hereditary hematological disorders, including megaloblastic anemia, iron deficiency anemia, aplastic anemia, anemia associated with liver disease, hereditary spherocytosis, SCA, and thalassemias [26]. The main reported mechanisms underlying this phenomenon are the consumption of cholesterol for red blood cell synthesis; serum cholesterol dilution due to the decrease in erythrocyte mass with increased plasma content. Belcher et al demonstrated that sickle-cell LDL was more susceptible to oxidation than control LDL and LDL vitamin E levels were significantly lower in SCA patients compared with control subjects. In addition, the cytotoxicity of partially oxidized LDL to endothelial cells suggest that oxidized LDL may be a marker of vasculopathy and oxidative stress.[11]

In this study, correlations between the lipid markers and inflammation were demonstrated as a negative correlation between cholesterol and hs-CRP and a positive correlation between TG/HDL-c and leukocytes. In SCD, high sensitivity C-

reactive protein (hs-CRP) was described as a low-grade marker of inflammation, correlated to episodes of vaso-occlusive events (VOC) [27]. Leukocyte count is an independent factor for SCA clinical severity. Patients with elevated leukocyte counts are more likely to die at younger age [28] and are more susceptible to develop ACS [29] and silent cerebral infarction [30]. These correlations may suggest the association between dyslipidemia, inflammation and vascular events in SCA. Activated leukocytes produce free radicals that increase the oxidation of LDL-c, the main carrier of cholesterol for tissues. Oxidized-LDL-c (LDL-ox) is withdrawn from the bloodstream through scavenger cell receptors. Endothelial cells and activated macrophages capture LDL-ox independent of cholesterol concentration [31].

TG/HDL-c values were positively correlated with LDH and negatively correlated with hemoglobin in the study. Hemolysis compromises the NO availability and is one of the main mechanisms of vasculopathy and chronic complications as pulmonary hypertension, priapism, stroke, and leg ulcers [32]. There was a significant positive correlation between TG/HDL-c ratio and blood flow velocity in the right and left cerebral arteries by transcranial Doppler. Blood flow velocity measured by transcranial Doppler is an important predictor of stroke risk, which increases with increasing maximum flow velocity. [33]. Stroke is one of the main causes of morbidity and mortality in SCA, affecting mainly children, especially those under 10 years of age, with occurrence rates of 1.02/100 in patients aged between 2 and 5 years and 0.79/100 in those between 6 and 10 years of age [34]. In this context, the TG/HDL-c ratio emerges as a potential marker of encephalic vascular injury, and should be included in the routine evaluation of these patients in order to provide earlier therapeutic interventions.

ACS predominated in the SCA group with very high TG/HDL-c ratio values. ACS is the second cause of hospitalization in patients over 2 years of age, the main cause of hospitalization in intensive care units and the main cause of mortality in SCA [35, 36]. In this study patients with SCA and TG / HDL above 2.73 mg/dL had a chance of 3.77, 95%CI (1.135 – 12.53) for STA episodes.

Our data reinforce the idea of the potential role of the lipid profile, especially the TG/HDL, as a marker of vascular events in children and adolescents with SCA. In addition, these findings reinforce the pathophysiological interrelationships between hemolysis, inflammation and lipoproteins in SCA vasculopathy.

There was no difference in the lipid profile between SCA patients with or without hydroxyurea treatment. The study design does not allow us to definitively conclude whether hydroxyurea treatment interferes with lipid levels in SCA, as we did not measure blood lipids before the drug administration nor performed a trial design to specifically test this hypothesis. Of note, this study had some additional limitations, which did not invalidate the results. The sample size of the subgroups may have prevented the detection of differences between SCA patients with and without endothelial dysfunction and between SCA patients using or not using hydroxyurea.

In summary, our findings demonstrate that children and adolescents with SCA in stable disease state present changes in lipid metabolism characterized by low levels of total cholesterol, LDL-c and HDL-c as well as high TG levels and TG/HDL-c ratio. The correlations between the levels of lipoproteins and markers of hemolysis and inflammation suggest the involvement of these mechanisms in the dyslipidemic profile of patients with SCA. The high frequency of ACS and VOE in SCA patients exhibiting elevated TG/HDL-c ratio values highlight association between dyslipidemia

and vascular events. Lastly, associations between the TG/HDL-c values and leukocyte counts, LDH concentrations, hemoglobin levels, blood flow velocity values in the middle cerebral artery and ACS, reinforce the potential of the TG/HDL-c as an early marker of vascular injury.

References

1. Weatherall DJ, Clegg JB. (2001) Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization*. 79(8):704-712. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2566499/> PMID: [11545326](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11545326/)
2. Stuart MJ, Nagel RL. (2004) Sickle-cell disease. *Lancet* 364(9442):1343-60 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17192-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17192-4) PMID: [15474138](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15474138/)
3. Hebbel RP, Vercellotti GM. The endothelial biology of sickle cell disease. *J Lab Clin Med*. 1997; 129:288-29
4. Solovey A, Yi Lin, B.S. Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating Activated Endothelial Cells in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med* 1997; 337:1584-1590. DOI: [10.1056/NEJM199711273372203](https://doi.org/10.1056/NEJM199711273372203)
5. Zorca S, Freema L, Hildesheim M, Allen D, Remaley T A, Taylor G J, Kato J G. (2010) Lipid levels in sickle-cell disease associated with haemolytic severity, vascular dysfunction and pulmonary hypertension. *British J Haematology*; 149(3): 436–445. DOI: [10.1111/j.1365-2141.2010.08109.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08109.x) PMID: [20230401](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20230401/)
6. Shores J, Peterson J, Vander Jagt D, Glew RH (2003) Reduced cholesterol levels in African-American adults with sickle cell disease; *J Natl Med Assoc*; 95(9): 813-817 *Journal of the National Medical Association*. PMID: [14527048](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14527048/)
7. Erasmus RT, Olukoga O, Ojuawo O. (1990) Plasma lipids and lipoproteins in Nigerian children with sickle cell anaemia. *Ann Trop Paed*. 10:421-423 <https://doi.org/10.1080/02724936.1990.11747468>
8. Seixas, M. O., Rocha, L. C., Carvalho, M. B., Menezes, J. F., Lyra, I. M., Nascimento, V. M., ... Goncalves, M. S. (2010). Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease. *Lipids in Health and Disease*, 9: 91. <http://doi.org/10.1186/1476-511X-9-91> PMID: [20799970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20799970/)
9. Windler E, Ewers-Grabow U, Thiery J, Walli A, Seidel D, Greten H. (1994). The prognostic value of hypocholesterolemia in hospitalized patients. *Clin Investig*. 72: 939-943.
10. Oztas Er Yesim, Sabuncuoglu Suna, Unal Selma, Ozgunes Hilal, Ozgunes Nuriman.(2011) Hypocholesterolemia is associated negatively with hemolysate lipid peroxidation in sickle cell anemia patients *Clinical and Experimental Medicine*. 11(3): 195–198. <http://dx.doi.org/10.1007/s10238-010-0124-3>

11. Belcher JD, Geiger P, Girotti AW, Steinberg MH, Hebbel RP, Vercellotti GM.(1999). Low-density lipoprotein susceptibility to oxidation and cytotoxicity to endothelium in sickle cell anemia. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 133(6):605–612 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(99\)90191-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2143(99)90191-9)
12. Da Luz PL, Favarato D, Faria-Neto JR Jr, Lemos P, Chagas AC.(2008) High ratio of triglycerides to HDL-cholesterol predicts extensive coronary disease. *Clinics* . 2008;63(4):427-32 doi: [10.1590/S1807-59322008000400003](https://doi.org/10.1590/S1807-59322008000400003) PMID: [18719750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18719750/)
13. World Health Organization. Child growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age. http://www.who.int/childgrowth/standards/bmi_for_age/en/
Access in: 15 outubro 2017
14. Wang W C, Ware R E, Miller, ST. *et al.* (2011) Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: A multicentre, randomized, controlled trial (BABY HUG). *The Lancet*. 377 (1663-1672) DOI:[10.1016/S0140-6736\(11\)60355-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60355-3) PMID: 21571150
15. Gladwin MT, Vichinsky E (2008) Pulmonary Complications of Sickle cell disease. *N, Engl. J. Med.* 359:2254-65. DOI:[10.1056/NEJMra0804411](https://doi.org/10.1056/NEJMra0804411) PMID:19020327
16. Platt OS. The acute chest syndrome of sickle cell disease. *N Engl J Med* 2000;342:1904–1907 [[PubMed](#)]
17. Adams R, Mckie V, Nichols F, Carl E. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.* 1992; 326(9):6.
18. Teixeira RS, Terse-Ramos R, Ferreira TA, Machado VR, Perdiz MI, Lyra IM, et al. (2017) Associations between endothelial dysfunction and clinical and laboratory parameters in children and adolescents with sickle cell anemia. *PLoS ONE*. 12(9):e0184076 PMID: 8863145 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184076>
19. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al.(2002) Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 39: 257-265 [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01746-6](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01746-6) PMID:11788217
20. Ladeia AM, Ladeia-Frota C, Pinho L, Stefanelli E, Adan L. Endothelial dysfunction is correlated with microalbuminuria in children with short-duration type 1 diabetes. *Diabetes Care*.2005; 28: 2048–2050. DOI: [10.2337/diacare.28.8.2048](https://doi.org/10.2337/diacare.28.8.2048) PMID:16043758

21. Järvisalo MJ, Rönnemaa T, Volanen I, et al. (2002) Brachial artery dilatation responses in healthy children and adolescents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 282:H87–H92. PMID:11748051 DOI: [10.1152/ajpheart.2002.282.1.H87](https://doi.org/10.1152/ajpheart.2002.282.1.H87)
22. Andrade ZM, Carvalhaes JTA, Taddei JAAC, Christofalo DMJ, Ajzen SA. (2005) Endothelial function of normotensive adolescents with no risk factors for arterial hypertension. *Jornal de Pediatria*. 81(5):395-9 <http://dx.doi.org/10.2223/1377>
23. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. (2013) V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq. Bras. Cardiol*. 101(4), supl.1. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.2013S010>
24. Oliveira C A, Oliveira M A, Oliveira N, Oliveira A, Almeida M, Veneza M L, Oliveira LA, Adan L, Ladeia M A. Is triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio a surrogates for insulin resistance in youth? *Health*. 2013; 5 (3): 481 DOI: [10.4236/health.2013.53066](https://doi.org/10.4236/health.2013.53066)
25. Naoum A F. (2005) Alterations of the lipid profile in anemia. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 27(3):223-226 <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842005000300018>
26. Yesim Oztas. (2016) Hypocholesterolemia: A Neglected Laboratory Finding. *Acta Medica*. 5: 19–22. ISSN 2147-9488. Available at: <http://actamedica.org/index.php/actamedica/article/view/4>
27. Suba Krishnan Yamaja Setty Suhita G. Betal Vaidyula Vijender Koneti Rao Carlton Dampier Marie Stuart (2010) Increased levels of the inflammatory biomarker C-reactive protein at baseline are associated with childhood sickle cell vasocclusive crises. *British Journal of Haematology*, 148, 797–804 . <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.08013.x>
28. Platt, O.S. et al. (1994) Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N. Engl. J. Med.* 330:1639–1644. PMID: 7993409 DOI: [10.1056/NEJM199406093302303](https://doi.org/10.1056/NEJM199406093302303)
29. Castro, O., et al. (1994) The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. *The Cooperative Study of Sickle Cell Disease*. *Blood*. 1994; 84:643–649 PMID: [7517723](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7517723/)
30. Kinney, T.R., et al. (1999) Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: a risk factor analysis. *The Cooperative Study of Sickle Cell Disease*. *Pediatrics* 103 (3):640–645. DOI: [10.1542/peds.103.3.640](https://doi.org/10.1542/peds.103.3.640)

31. Chait A. (1983) The role of lipoprotein receptors in lipid transport and in the pathogenesis of the hyperlipoproteinemias. Special Topics in Endocrinology and Metabolism. 5:1-53 PMID: 6322371
32. Kato GJ, Hebe RP, Steinberger MH, Galdino M. (2009) Vasculopathy in Sickle Cell Disease: Biology, Pathophysiology, Genetics Translational Medicine and New Research Directions. *Am J Hematol*. 84(9): 618–625. PMID:19610078
<https://doi.org/10.1002/ajh.21475>
33. Kassim A, DeBaun MR. (2013) Sickle cell disease, vasculopathy, and therapeutics. *Annu. Rev. Med.* 64:451–66. DOI: [10.1146/annurev-med-120611-143127](https://doi.org/10.1146/annurev-med-120611-143127) PMID:23190149
34. Enniful-Eghan H, Moore RH, Ichord R, Smith-Whitley K, Kwiatkowski JL. (2010) Transcranial Doppler ultrasonography and prophylactic transfusion program is effective in preventing overt stroke in children with sickle cell disease. *J. Pediatr.* 157(3):479–84. DOI: [10.1016/j.jpeds.2010.03.007](https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.03.007) PMID: 20434165
35. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, et col and The Cooperative Study of Sickle Cell Disease.(1994) Acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. *Blood*. 84 (2) : 643-649 PMID:7517723
www.bloodjournal.org
36. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, et al. (2000) Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. *N Engl J Med*. 342:1855-65. DOI: [10.1056/NEJM200006223422502](https://doi.org/10.1056/NEJM200006223422502) PMID: 10861320

Table 1. Characteristics of the study participants

Characteristic	SCA patients	Controls	p
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
Age (Years)	12.44 \pm 3.19	11.41 \pm 3.17	0.123
Gender			
Male n (%)	31 (56.40)*	14 (34,10)*	0,031
Nutritional Evaluation			
Body Mass Index (Kg/m ²)	16.74 \pm 2.30	18.61 \pm 3.96	0.011
Z score BMI	-0.92 \pm 0.99	-0.12 \pm 1.36	0.003
Peripheral Oxygen Saturation (%)	93.90 \pm 3.68	97.66 \pm 0.96	<0.001
Hemolysis			
RBC ($\times 10^9$ /cu mm)	2.69 \pm 3.09	4.64 \pm 0.36	<0.001
Hemoglobin (g/dL)	8.04 \pm 0.84	13.13 \pm 1.10	<0.001
Hematocrit (%)	23.94 \pm 3.09	39.36 \pm 3.18	<0.001
Mean Cell Volume (fL)	90.81 \pm 10.82	83.42 \pm 6.78	0.007
Mean Cell Hemoglobin Concentration (pg)	28.29 \pm 3.73	27.14 \pm 1.95	0.503
Reticulocyte Count (%)	7.62 \pm 4.89	0.80 \pm 0.22	<0.001
Leukocytes			
Leukocyte Count ($\times 10^9$ /L)	12.15 \pm 3.71	7.21 \pm 1.53	<0.001
Neutrophil Count (%)	48.82 \pm 16.32	50.46 \pm 13.07	0.706
Monocyte Count (%)	8.15 \pm 3.33	7.75 \pm 2.12	0.564
Platelets			
Platelet Count ($\times 10^9$ /L)	454.70 \pm 139.01	281.16 \pm 47.32	<0.001
Hemolysis plus Hepatic			
Aspartate aminotransferase (U/L)	50.90 \pm 21.92	23.16 \pm 12.28	<0.001
Total bilirubin (mg/dL)	3.25 \pm 1.90	0.42 \pm 0.26	<0.001
Direct bilirubin (mg/dL)	0.69 \pm 0.75	0.09 \pm 0.08	<0.013
Indirect bilirubin (mg/dL)	2.62 \pm 1.86	0.33 \pm 0.18	<0.001
Lactate dehydrogenase(U/L)	1184.47 \pm 576.67	387.30 \pm 32.76	<0.001
Hepatic			
Alanine aminotransferase (U/L)	27.05 \pm 17.18	16.79 \pm 8.79	<0.003
Inflammation			
C-reactive protein (mg/L)	2,4 (1 – 4) ⁺	0,8 (0,2 -2) ⁺	<0.001
Endothelial Function			
Flow Mediated Dilatation (%)	10.91 \pm 5.93	15.76 \pm 8.27	0.002

Independent Sample T test, * Chi-square test, + Mann-Whitney test

Table 2. Characteristics of the lipids profile between SCA group and healthy group

Characteristic	SCA patients	Controls	<i>p</i>
	Mean ± SD	Mean ± SD	
Lipid metabolism			
Total Cholesterol (mg/dL)	119.16 ± 23.66	154.98 ± 27.33	<0.001
HDL Cholesterol (mg/dL)	33.44 ± 14.24	47.22 ± 11.62	<0.001
LDL Cholesterol (mg/dL)	67.49 ± 22.01	90.42 ± 22.51	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	105.56 ± 43.16	74.06 ± 25.87	<0.001
Triglycerides/HDL-c ratio	3.64 ± 2.14	1.70 ± 0.82	<0.001

Independent Sample T test

Table 3. Characteristics of the SCA hydroxyurea treated group (SCA yes HU) and SCA hydroxyurea no treated (SCA no HU)

Characteristics	SCA no HU	SCA yes HU	<i>p</i>
	(n=31)	(n=24)	
Hemoglobin (g/dL)	7,9 ± 0,8	8,2 ± 0,9	0,29
Fetal Hemoglobin (g/dl)	6,7 ± 5	8,6 ± 6,4	0,39
Mean Cell Volume (fL)	86.7 ± 9.8	94.9 ± 10.9	0.01
Leukocyte Count (× 10 ⁹ /L)	12,6 ± 3,2	11,7 ± 4,3	0,41
Platelet Count (× 10 ⁹ /L)	458 ± 106	469 ± 148	0,75
Reticulocyte Count (%)	8 ± 5	7,4 ± 5	0,70
Lactate dehydrogenase(U/L)	1369 ± 636	980 ± 432	0,03
Aspartate aminotransferase (U/L)	55 ± 21	46 ± 22	0,20
Alanine aminotransferase (U/L)	27.9 ± 18,5	26.1 ± 16	0.72
C-reactive protein (mg/L)	2,2(0,95-3,7)*	2,6(1,4-7,5)*	0,44
Total Cholesterol (mg/dL)	124 ± 22	115 ± 26	0,88
LDL Cholesterol (mg/dL)	67 ± 24	69,6 ± 23	0,50
HDL Cholesterol (mg/dL)	34,6 ± 9,4	33 ± 5,7	0,70
Triglycerides (mg/dL)	104 ± 47	99,5 ± 28,6	0,40
Triglycerides/HDL-c ratio	3,95±2,3	3,2±1,9	0,22
Flow Mediated Dilatation (%)	11,6 ± 5,7	10 ± 5,7	0,32

Independent Sample T test, * Mann-Whitney test

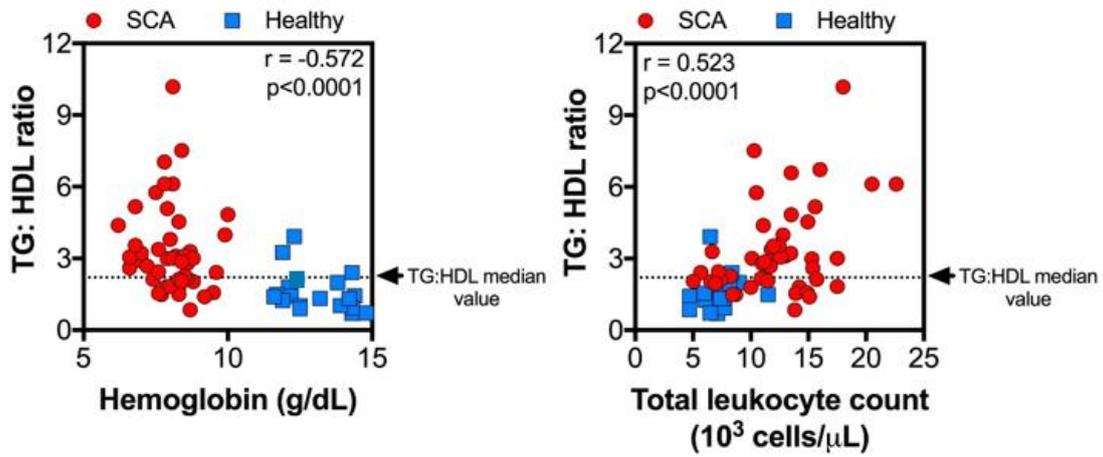


Figure 1. Correlation between TG/HDL-c ratio and hemoglobin in SCA and healthy groups

Figure 2. Correlation between TG/HDL-c ratio and total leukocyte count in the SCA and healthy groups

Anexo 9 – Artigo Submetido

Cytokines Profile in Children and Adolescents with Sickle Cell Anemia: Associations with Lipid Profile, Laboratory and Clinical Manifestations

Rozana Santos Teixeira^{1,2}, Tatiane Ferreira², Regina Terse Ramos², Vinicius Ramos¹, Paulo Mattos^{3,4}, Lyra IM⁵, Mara R. R. Lago⁶, Joely Merriman⁷, Bruno Bezerril Andrade^{1,4,*}, Ana Marice Ladeia^{1,8}

1. Pediatrics Department, Bahiana School of Medicine and Public Health, Bahia Foundation for the Development of Sciences Salvador, Salvador, Bahia, Brazil

2. Pediatrics Department School of Medicine, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

3. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil University of Salvador, Salvador, Bahia, Brazil

4. Multinational Organization Network Sponsoring Translational and Epidemiological Research (MONSTER) Initiative, Fundação José Silveira, Salvador, Bahia, Brazil

5. University Salvador-Laureate International Universities and Professor Edgar Santos Hospital- Pediatric Hematology, Salvador, Bahia, Brazil

6. Department of Life Science, State University of Bahia

7. Medical Student of Rochester University, NY, USA

8. Post graduate Course of Medicine and human Health Bahiana School of Medicine and Public Health, Bahia Foundation for the Development of Sciences, Salvador, Bahia, Brazil

*Corresponding author: bruno.andrade@bahia.fiocruz.br (BBA),

rozateixeira@bahiana.edu.br (RST)

Disclosure of Interest: We have no conflicts of interest to disclose

Acknowledgements: The authors would like to thank the Hematology and Hemotherapy Foundation of Bahia (HEMOBA) for their critical assistance in patient recruitment and evaluation.

Funding: This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) under notice number 020/201- Research Program: shared health management – (PPSUS) of Bahia award number: EFP00006943. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Availability of the data and materials: The datasets supporting the conclusion of this article are included within the article.

Abstract

Background: Sickle cell anemia is a hemoglobinopathy that produces a chronic inflammatory state. Cytokines play an important role in this process. Dyslipidemia occurs in SCA and there are few studies demonstrating its association with cytokines. **Objectives:** (1) Evaluate the cytokine profile in children and adolescents with SCA and its correlation with their lipid profile, laboratory markers and clinical events. (2) Evaluate the impact of hydroxyurea therapy on cytokine level. **Methodology:** The study involved 55 stable children and adolescents with HbSS, 24 using HU, and 41 healthy children ages 6 to 18. Interleukins 6, 8, 10, 12p70, 1 β , 17A and TNF- α were measured with Luminex technology. ANOVA test analysis, hierarchical cluster analysis, were performed to evaluate differences between study groups. **Results:** The groups were similar in age: 13.20 \pm 2.82 years in SCA HU untreated group, 11.46 \pm 3.49 years in SCA HU therapy and 11.41 \pm 3.17 in control group, ($p=0.054$) as well as in gender ($p=0.115$). There was an increase in the cytokines levels, leukocyte count and hs-CRP in the SCA group when compared with the healthy group. Two distinct profiles were observed: (1) a hemolytic profile in SCA-HU untreated group, which also showed an increased TG/HDL-c ratio, and (2) an inflammatory profile in the SCA-HU therapy group. A positive correlation between IL-17A, IL-8 and number of vaso-occlusive events (VOE) and IL-17A, IL-8 and VOE emergency care was observed. A positive correlation between TNF- α and blood transfusions total number, TG/ HDL-c ratio and LDH was also observed. IL-10 was negatively correlated with number of leukocytes. **Conclusion:** A chronic inflammatory state predominated in the group of SCA children and adolescents in stable state under treatment with HU. Elevation of cytokines is associated with disease severity. Individuals not treated with HU have a hemolytic profile associated with an increased TG/HDL-c ratio.

Key words: cytokines, interleukins, Sickle Cell Anemia, hydroxyurea, lipoproteins

Introduction

Sickle cell anemia (SCA) is the most prevalent monogenic hematologic disease worldwide [1]. It's a multisystemic disease defined clinically by acute events and progressive organic damage. In SCA, early diagnosis and multidisciplinary follow-up are fundamental in reducing mortality rates. Epidemiologic studies have shown that absence of early diagnosis and multidisciplinary follow-up contributes to a reduced life span in children with SCA [2].

The interaction of polymerized deoxyhemoglobin S with vascular endothelium results in inflammation, vaso-occlusive events and ischemia [3, 4]. In this context, cytokines have a fundamental role because their ability to increase the adhesion of sickle cells and neutrophils in the blood vessel, activate the vascular endothelium and platelets, stimulate the production of endothelin and hematopoiesis, and participate in dysregulation of apoptosis [5]. In sickle cell disease in a steady state an increase of the proinflammatory cytokines as IL-6, IL-8, IL-1 β , IL17A and TNF- α in vaso-occlusion events has been described [6,7,8,9], but some these results are contradictory. Additionally, no pattern of cytokines seems to correlate specifically with clinical manifestations in SCA [10]. Few studies evaluating cytokine profiles have been performed in children with SCA [11, 12].

Sickle cell anemia is capable of altering lipid metabolism, promoting a reduction in total cholesterol, high density lipoprotein (HDL-c), low density lipoprotein (LDL-c), and increased levels triglycerides (TG) and TG/HDL-c ratios [13, 14]. Some articles have described the relationship of lipid profile and inflammatory status in other diseases such as systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, psoriasis, periodontal disease and infectious process [15]. These studies demonstrated that TNF α , IL-1, IL-2, and IL-6 increase serum levels of triglycerides and VLDL. The inflammation promotes tissue lipolysis, increasing the supply of free fatty acids to the liver and increasing the synthesis of triglycerides. Furthermore, it has been reported in some inflammatory diseases a decrease in lipoprotein lipase activity synthesized by endothelial cells, reducing the lipolysis of TG transported by chylomicrons and by very low density lipoprotein [15]. These alterations in lipid metabolism increase the risk of cardiovascular events. There are few studies directly addressing the possible associations between inflammatory mediators, lipid profile and clinical manifestations; however, assays in this area can help identify new sub-phenotypes

and understanding of changes in lipid metabolism in SCA. The aim of the current study was to evaluate the profile of cytokines in children and adolescents with SCA and their associations with lipid metabolism and laboratory characteristics, and also investigate the impact in these profiles during treatment with hydroxyurea.

METHODOLOGY

This is a cross-sectional study involving children and adolescents aging 6 to 18 years, with hemoglobin SS, treated or not treated with hydroxyurea (HU), and a comparison group composed of healthy children without hemoglobinopathy. Participants with SCA were recruited from two reference centers for care and treatment of hematologic disease, while the comparison group was recruited from general and preventive pediatric outpatient clinics at public hospitals. This study included a recruited cohort for evaluation of respiratory and cardiovascular manifestations in children and adolescents with SCA with already published results [16, 17, 18]. All participants agreed to participate after signing the free and informed consent form in accordance with Resolution 466 of the National Health Council [19]. All institutions participating in the study authorized the collection of data. This study was approved by the Ethics Committee of the Bahiana School of Medicine and Public Health, protocol number 568.913 / 2014.

Inclusion and Exclusion Criteria

Patients with hemoglobin SS, without acute complications or infectious pictures in the last month and healthy children with the same age group with Hb AA without chronic diseases or infections in the last month were included. SCA patients with previous cerebrovascular accident or blood transfusion in the last three months were excluded. Dyslipidemia and obesity were exclusion criteria for the healthy group. The dyslipidemia criteria was based on the V Brazilian Guideline on Dyslipidemia and Prevention of Atherosclerosis [20] and the obesity criteria was based on anthropometric index BMI / age above Z score +2, according to WHO charts 2007 [21]. The demographic and clinical data was evaluated through a standardized questionnaire and medical records. Physical examination included

anthropometric data and measurement of blood pressure and peripheral oxygen saturation.

Laboratory data

Laboratory data was collected after the endothelial dysfunction test, after at least 8 hours of fasting. Concentrations of IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, TNF- α were measured in frozen plasma samples stored at -80° using the Luminex assay (Bio-Rad, Hercules, CA). The lipid profile included the determination of total cholesterol (TC), HDL-c, LDL-c and triglycerides (TG) by enzymatic method. The high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) values were determined by turbidimetry method in a reference laboratory. The other exams were part of the outpatient routine, including transcranial Doppler, ALT, AST, LDH, bilirubin and blood count parameters.

Evaluation of endothelial function

To evaluate the endothelium-dependent vasodilation, we used a protocol established under the guidelines for ultrasonographic evaluation of the forearm [22]. Briefly, the examinations were performed using the VIVID 3 ultrasound scanner (GE Healthcare) 12 MHz multi-frequency transducer. The endothelium-dependent vasomotor function (VMF) was assessed using flow-mediated vasodilation (FMD) by reactive hyperemia. The examinations were performed by a trained physician with proven experience in the technique [17,18,23]. Throughout the examination, a synchronized electrocardiogram was obtained.

Endothelial dysfunction was defined as the value of flow-mediated vasodilation below the 10th percentile of the healthy group, according to a study by Jarvisalo et al. and Andrade et al [24, 25].

Clinical Event Definitions

Vaso-occlusion episodes (VOE) [26] were described as pain symptoms warranting analgesia. ACS [27] was defined as new pulmonary infiltrate involving at

least one segment of the lung, isolated atelectasis with one or more associated respiratory symptoms.

Statistical analysis

ANOVA test analysis was used to compare the means between groups and chi-square test to compare categorical variables when indicated. Spearman's correlation was used to evaluate associations between continuous variables. The cut-off point for the triglyceride / HDL-c ratio (TG / HDL-c) was 2.73 according to a study by Oliveira et al [28]. The TG / HDL-c ratio was dichotomized in TG / HDL-c above the value 2.73 and below the value 2.73. Cytokine values were compared between these groups by the Mann-Whitney test, being significant if $p < 0.05$. Data analysis was performed using IBM software - SPSS Chicago, IL, USA. 20.0.

Using the JMP 10.0 software, the geometric mean values (log₁₀) for each marker were calculated for the study population. To evaluate the general expression pattern of these markers in each group the heat map was done, using the variation of geometric mean values calculated for each candidate biomarker. Hierarchical clustering using the Ward method was employed to identify the marker patterns.

RESULTS

This study included a total of 96 children and adolescents aged of 6 to 18 years: 31 HbSS untreated with hydroxyurea (SCA no HU), 24 HbSS receiving HU (SCA HU) and 41 healthy individuals (control group). The mean age (years) was similar across groups (13.2 ± 2.8 ; 11.5 ± 3.0 ; 11.4 ± 3.2 $p = 0.054$ respectively), as well male gender: SCA no HU, 17(56, 7%); SCA HU 13 (54.2%), control group 14 (43.1%) $p = 0.115$. The SCA groups had lower mean body mass index (BMI) z scores $p < 0.001$, SpO₂ $p < 0.001$, hemoglobin $p < 0,001$ and glycemia ($p = 0.013$) when

compared to control group (CG). The largest mean difference in BMI z score was between the SCA HU and CG (-2.28 ± 0.81 $p = 0.017$). Regarding glycemia, the highest mean difference occurred between the SCA HU and CG (-11.35 ± 4.17 $p = 0.029$). The SCA groups had a higher mean of leukocytes ($p < 0.001$), globular volume ($p < 0.001$), platelets ($p < 0.001$), reticulocytes ($p < 0.001$), lactic dehydrogenase (LDH) ($p < 0.001$), total bilirubin ($p < 0.001$), indirect bilirubin (IB) ($p = 0.001$), direct bilirubin (DB) ($p = 0.008$) and aspartate aminotransferase (AST) ($p < 0.001$).

The SCA groups and control group were similar for systolic blood pressure ($p = 0.261$), diastolic blood pressure ($p = 0.277$) and for alanine aminotransferase ($p = 0.071$). The SCA groups differed in LDH values ($p = 0.049$), MGV ($p = 0.014$) and peripheral oxygen saturation ($p = 0.033$). The LDH was higher in SCA no HU and MGV and peripheral oxygen saturation were higher in the SCA HU group. Fetal hemoglobin (HbF) was similar between the SCA no HU group (6.794 ± 5.29) vs SCA HU group (8.635 ± 6.41) ($p = 0.389$). **(Table 1)**

Assessment of endothelial dysfunction

The flow-mediated vasodilation (FMD) was lower in the SCA HU and SCA no HU group vs control group ($11.6\% \pm 5.7$, $10\% \pm 5.7$ vs $15.8 \pm 8.3\%$, $p = 0.004$), and similar between SCA groups ($p = 1.000$). **(Graph 1)** The cutoff value for endothelial dysfunction was 8.5% (control group 10th percentile). The FMD, in the 10th percentile SCA group was 4.8% and 50th percentile FMD was 10%. Endothelial dysfunction predominated in the SCA group, 20 (36.4%) vs control group 4 (9.8%), being similar between SCA no HU 9 (30%) vs SCA HU group 11 (45.8 %) ($p = 0.231$).

Assessment of lipid profile

The SCA groups had lower values for total cholesterol ($p < 0.001$), HDL-c ($p < 0.001$), LDL-c ($p < 0.001$) and higher triglyceride levels ($p < 0.001$) and TG/HDL-c ratio ($p < 0.001$) when compared to the control group. There was no difference in the lipid profile between the groups treated and not HU treated. The largest mean difference in TG was between the SCA HU and CG (33.79 ± 9.03 , $p < 0.001$). **(Table 2)**

Assessment of inflammatory profile through cluster analysis and associations with markers of hemolysis and lipid profile

A cluster analysis of how the three groups differed in relation to inflammation markers (leukocyte counts, hs-CRP, interleukins IL-1 β , IL-6, IL-8, IL 10, IL-12p70, IL-17A, TNF α), hemolysis markers (hemoglobin, hematocrit, reticulocytes, lactic dehydrogenase, bilirubins, ALT, AST), the TG/HDL-c ratio and FMD was done. These markers were represented in red when they reached higher values and blue when they reached lower values. **(Fig1A)**

It was observed that hemolysis markers were higher in the SCA no HU group, inflammation markers were higher in the SCA HU group, and values of hemoglobin, IL-10 and FMD were higher in the healthy group, indicating better endothelium-dependent vasodilatory capacity **(Fig. 1A)**. Analysis of the main component showed that SCA HU, SCA no HU and healthy group, distanced themselves in distinct areas, forming 3 sub-phenotypes. **(Fig. 1B)** The vector analysis demonstrated the variables that influenced the differentiation of the groups **(Fig. 1C)**. These analysis showed three different laboratory profiles: the SCA no HU group presented more hemolysis, with increased value of LDH, aminotransferase, indirect bilirubin and lower values of

hemoglobin and hematocrit, associated with the increase in TG/HDL-c ratio, leukocyte count and IL-12p70; the SCA HU group had a markedly inflammatory profile (IL, TNF α and hs-CRP). The healthy group had higher hemoglobin value, increased IL-10 (anti-inflammatory action) and increased vasodilatory capacity (without endothelial dysfunction).

Correlations between interleukins, endothelial dysfunction, clinical events and lipid profile

There was a positive correlation between the number of vaso-occlusive events (VOE) in the last year and IL-17A (rs= 0.271, p = 0.048) and IL-8 (rs= 0.275, p = 0.045), as well as between VOE number emergency care and IL-17A (rs= 0.296, p = 0.03) and IL-8 (rs= 0.336, p = 0.013). A positive correlation between TNF- α and number of blood transfusions (rs= 0.34, p = 0.016) and negative correlation between IL 10 and number of leukocytes (rs= -0.391, p = 0.007) were also observed. TG/HDL-c ratio presented correlation com LDH (rs= 0,325 p=0,032). There were no significant correlations between interleukins and lipid profile, interleukins, lipid profile or FMD (endothelial dysfunction).

DISCUSSION

Studies to date involving cytokines in SCA have been controversial. They have not demonstrated a defined profile of these mediators in the stable state [29, 30] and during VOC [31, 32], and few studies have been performed with children [33, 34, 35]. Few correlations between cytokines and clinical and laboratory markers in SCA have been reported and are not specific. Several authors evaluated different cytokine panels in their samples, which made it difficult to generalize. In addition, the association between lipid profile and cytokines has not been studied.

In this study, cluster analysis demonstrated increased cytokine levels in SCA group, prevailing among those treated with HU, in addition to elevation of leukocytes and hs CRP characterizing inflammatory status in children and adolescents in stable state of the disease.

The increase of cytokine levels in sickle-cell anemia involved several factors as activation of the endothelium and leukocytes, tissue ischemia and subclinical microinfarcts. Activated macrophages and monocytes stimulate the release of IL-1 β and TNF- α and the activated endothelium stimulates the production of IL-6 and IL-8. [31]. Tissue ischemia promotes the release of cytokines, such as IL-6 and TNF- α , which increase the production of acute phase proteins by the liver [36].

In this study, the involvement of cytokines in the SCA pathogenesis was demonstrated by positive correlations between IL-8 and IL-17A with VOC and VOC numbers requiring medical attention. IL-8 is synthesized by macrophage, has chemotactic action for neutrophils and T lymphocytes, stimulates inflammation and increases the expression of adhesion molecules (V-CAM and I-CAM), mechanisms that are involved in vasocclusion. IL-17 stimulates the production of proinflammatory cytokines, especially IL-8. Some authors have suggested that IL-8 could be used as a marker of severity in SCA [8] and that high levels of IL-8 in an asymptomatic state could predict VOC risk [32]. The positive correlation between TNF α and total number of blood transfusions, variable related to phenotype of greater severity, reinforces the importance of inflammatory profile in SCA pathogenesis.

The lipid profile evaluation showed lower levels of total cholesterol, HDL-c and LDL-c and higher levels of TG/HDL-c ratio and triglycerides when compared to healthy controls. These findings were described by other authors evaluating adults and children of different ethnicities and geographic regions [13, 37, 38]. Cholesterol

is one of the main components of the cell membrane, accounting for 40% of its constitution [39]. LDL-c is the lipoprotein with the highest cholesterol content and the main one responsible for the supply of this metabolite to the cells. The main mechanisms related to hypocholesterolemia in SCA would be: a) the consumption of cholesterol for red blood cell synthesis due to increased hemolysis, b) dilution of serum cholesterol due to decreased erythrocyte mass and increased plasma content [39], or c) oxidative stress favoring the oxidation of LDL-C and increasing the removal of this lipoprotein from the circulation [37]. Thus, our data confirm this dyslipidemic profile in SCA patients.

Studies on inflammatory and infectious diseases [15] have demonstrated that TNF α , IL-1, IL-2, IL-6 increase serum triglyceride and very low density lipoprotein (VLDL) levels. The inflammation promotes tissue lipolysis, increasing the supply of free fatty acids to the liver and increased synthesis of triglycerides. It has been reported that in some inflammatory diseases there is a decrease in lipoprotein lipase activity synthesized by endothelial cells, reducing the lipolysis of TG transported by chylomicrons and VLDL. Although SCA presents a chronic inflammatory state and dyslipidemic profile, both of which are associated in pathologies such as obesity, cardiovascular disease and autoimmune disease, in this study no correlation between cytokines and lipid profile was observed.

Cluster analysis allowed the identification of three sub-phenotypes: hemolytic, inflammatory and healthy profiles. The SCA HU treatment patients formed the inflammatory sub-phenotype. This group received a higher number of blood transfusions throughout the life, suggesting a more serious evolution.

In the SCA no HU group there were elevated levels of hemolysis markers (LDH, reticulocytes, BI, TGO), lower hemoglobin levels and increased TG/HDL-c

ratio. This group had LDH levels, significantly higher when compared to the SCA HU group. The literature has demonstrated the HU ability to reduce hemolysis by increasing the HbF intra-erythrocyte concentration and decreasing polymerization [40]. This mechanism may justify the reduction of hemolysis observed in patients HU treated. On the other hand, the increase of cytokines in the SCA HU treated group could suggest a proinflammatory effect of this medication. However, some studies have shown a possible anti-inflammatory action by reducing neutrophil count, reducing the expression of adhesion molecules as well as reducing the expression of E-selectin, P-selectin, ICAM (intercellular adhesion molecules), PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) and VCAM-1 (vascular cell adhesion protein 1)[41]. A recent longitudinal study by Rhiannon et al (2017) [42] involving children HbSS and HbS β thalassemia, demonstrated that HU therapy reduced the inflammatory molecules levels more efficiently than blood transfusion therapy when compared to healthy controls, but not completely, which justifies research including other drugs to be used in association with HU. The markers that showed significant reduction with HU continuous use over a two year period were IFN α 2, VCAM-1, CD40L, EGF, E-selectin, IL-7, MIP-1 α and MIP-1 β , cytokines that were not tested in our study. In addition, the cross-sectional design of this study limited the assessment of the impact of HU treatment because the previous cytokines levels were not known.

CONCLUSIONS

Children and adolescents in the SCA steady state present with a chronic inflammatory profile characterized by cytokine elevation, which is associated with VOC and a greater need for blood transfusions, suggesting that inflammation is related to severe clinical course. This study allowed us to identify two sub-

phenotypes among children and adolescents with sickle cell anemia: an inflammatory profile formed by patients SCA HU treated and a hemolytic profile formed by patients HU not treated and who presented increased TG / HDL-c ratio.

REFERENCES

1. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *The Lancet* 2012; 381(9861): 142-151. Doi.org/10.1016/50140-6736(12)61229-X
2. Brasil. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Perfil Demográfico da Doença Falciforme no Brasil. <http://u.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/955-sas-raiz/dahu-raiz/sangue-e-hemoderivados/l2-sangue-e-hemoderivados/13335-doenca-falciforme>
3. Frenette OS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J. Clin. Invest.* 2007; 117(4):850-858
4. Platt OS. Sickle cell anaemia as an inflammatory disease. *J Clin Invest.* 2000; 106(3):337-338
5. Makis AC, Hatzimichael EC, Bourantas KL. The Role of Cytokines in Sickle Cell Disease. *Ann. Hematol.* 2000; 79:407-413
6. Pathare A, Kindi S.A, Alnaqdy AA, *et al.* Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Am J Haematol.* 2004; 77:323-328
7. Gonçalves, M.S., Queiroz, I.L., Cardoso, S.A., Zanetti, A., Strapazoni, A.C., Adorno, E., Albuquerque, A., Sant'Ana, A., dos Reis, M.G., Barral, A. and Barral Netto, M. Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research.* 2001; 34: 1309-1313.
8. Keikhaei B, Mohseni AR, Norouzirad R, *et al.* Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. *Eur Cytokine Netw.* 2013;24(1):45-52)
9. Graidó-González E, Doherty JC, Berggreen EW, Organ G, Telfer M., McMillen MA. Plasma Endothelin-1, Cytokine, and Prostaglandin E2 Levels in Sickle Cell Disease and Acute Vaso-Occlusive Sickle Crisis. *Blood.* 1998; 92(7): 2551-2555
10. Asare, K., Gee, B.E., Stiles, J.K., Wilson, N.O., Driss, A., Quarshie, A., Adams, R.J., Kutlar, A. and Hibbert, J.M. Plasma interleukin-1beta concentration is

associated with stroke in sickle cell disease. *Cytokine*. 2010; 49:39-44. [doi:10.1016/j.cyto.2009.10.002](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.10.002)

11. Akohoue AS, Shankar S, Milne GL, Morrow J, Chen KY, Ajayi WU, Buchowski MS. Energy expenditure, inflammation, and oxidative stress in steady-state adolescents with sickle cell anemia. *Pediatr Res*. 2007;61(2):233-8.

12. Sarray S, Saleh LR, Lisa Saldanha F, Al-Habboubi HH, Mahdi N, Almawi WY. Serum IL-6, IL-10, and TNF α levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. *Cytokine*. 2015; 72(1):43-7. doi: 10.1016/j.cyto.2014.11.030. Epub 2015 Jan 5.

13. Shores J, Peterson J, Vander Jagt D, Glew RH. Reduced cholesterol levels in African-American adults with sickle cell disease; *J Natl Med Assoc*, 2003; 95(9): 813-817. PMID: [14527048](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14527048/)

14. Zorca S, Freema L, Hildesheim M, Allen D, Remaley T A, Taylor G J, Kato J G. (2010) Lipid levels in sickle-cell disease associated with haemolytic severity, vascular dysfunction and pulmonary hypertension. *British J Haematology*; 149(3): 436–445. DOI: [10.1111/j.1365-2141.2010.08109.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08109.x) PMID: 20230401

15. Khovidhunkit, W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res*. 2004; 45(7): 1169-96 PMID: [15102878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15102878/)

16. Teixeira RS, Terse-Ramos R, Ferreira TA, Machado VR, Perdiz MI, Lyra IM, Nascimento VL, Boa-Sorte N, Andrade BB, Ladeia AM. Associations between endothelial dysfunction and clinical and laboratory parameters in children and adolescents with sickle cell anemia. *PLoS One*. 2017; 12(9):e0184076. doi: 10.1371/journal.pone.0184076. eCollection 2017

17. Rissatto-Lago MR, Salles C, Gesteira FCP, Lyra IM, Ramos RT, Teixeira R & Ladeia AM. Association between endothelial dysfunction and otoneurological symptoms in children with sickle cell disease. *Hematology*. 2017; 22(5):299–303. <http://dx.doi.org/10.1080/10245332.2016.1261982>

18. Rissatto -Lago MR., Fernandes LDC, Lyra IM, Ramos RT, Teixeira R, Salles C, Ladeia AMT. Sensorial hearing loss in children with sickle cell anemia and its association with endothelial dysfunction. *Hematology*. 2018; 28:1-7. doi: 10.1080/10245332.2018.1478494.

19. Brazil. Ministério da Saúde; Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html

20. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arq. Bras. Cardiol. São Paulo. 2013; 101(4), supl.1.
21. World Health Organization. Child growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age. http://www.who.int/childgrowth/standards/bmi_for_age/en/
22. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. J Am Coll Cardiol. 2002; 39:257-65
23. Sampaio RR, Ladeia AM, Meneses RB *et al.* C-reactive protein does not correlate with endothelial dysfunction in women with overweight and obese. J. Clin Med Res. 2013; 5(4):294-9.
24. Järvisalo MJ, Rönnemaa T, Volanen I, et al. Brachial artery dilatation responses in healthy children and adolescents. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002;282:H87–H92
25. Andrade ZM, Carvalhaes JTA, Taddei JAAC, Christofalo DMJ, Ajzen SA. Endothelial function of normotensive adolescents with no risk factors for arterial hypertension. Jornal de Pediatria. 2005; 81(5):395-9
26. Wang W C, Ware R E, Miller ST *et al.* Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: A multicentre, randomized, controlled trial (BABY HUG). The Lancet. 2011; 377 (1663-1672)
27. Heeney M. Mahoney D. The acute chest syndrome in children and adolescents with sickle cell disease. In UpToDate. 2014. Disponível em <http://www.uptodate.com>.
28. Oliveira A C, Oliveira A M, Oliveira N et al. Is triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio a surrogates for insulin resistance in youth? Health. 2013; 5:481- 485.
29. Croizat H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. Brit J Haematol.1994; 87: 592-594
30. Bourantas KL, Dalekos GN, Makis A, Chaidos A, Tsiara S, Arvides AM. Cytokines and acute-phase proteins during the steady state of sickle cell disease. Eur J Hematol. 1998; 61:49-54
31. Pathare A, Kindi S.A, Alnaqdy AA, *et al.* Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. Am J Haematol. 2004; 77:323-328
32. Gonçalves, M.S., Queiroz, I.L., Cardoso, S.A., Zanetti, A., Strapazoni, A.C., Adorno, E., Albuquerque, A., Sant’Ana, A., dos Reis, M.G., Barral, A. and Barral

- Netto, M. Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*. 2001; 34: 1309-1313.
33. Akohoue AS, Shankar S, Milne GL, Morrow J, Chen KY, Ajayi WU, Buchowski MS. Energy expenditure, inflammation, and oxidative stress in steady-state adolescents with sickle cell anemia. *Pediatr Res*. 2007;61(2):233-8.
34. Sarray S, Saleh LR, Lisa Saldanha F, Al-Habboubi HH, Mahdi N, Almawi WY. Serum IL-6, IL-10, and TNF α levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. *Cytokine*. 2015;72(1):43-7. doi: 10.1016/j.cyto.2014.11.030. Epub 2015 Jan 5.
35. Hibbert JM, Hsu LL, Bhatena SJ, Irune I, Sarfo B, Creary MS, Gee BE, Mohamed AI, Buchanan ID, Al-Mahmoud A, Stiles JK. Proinflammatory Cytokines and the Hypermetabolism of Children with Sickle Cell Disease. *Exp. Biol. Med (Maywood)* 2005;230(1):68-74
36. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994; 15:74–80
37. Erasmus RT, Olukoga O, Ojuawo O. Plasma lipids and lipoproteins in Nigerian children with sickle cell anaemia. *Ann Trop Paed*. 1990; 10:421-423 <https://doi.org/10.1080/02724936.1990.11747468>
38. Seixas, M. O., Rocha, L. C., Carvalho, M. B., Menezes, J. F., Lyra, I. M., Nascimento, V. M.,Goncalves, M. S. Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease. *Lipids in Health and Disease*. 2010; 9: 91. <http://doi.org/10.1186/1476-511X-9-91> PMID: [20799970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20799970/)
39. Naoum F A. Alterations of the lipid profile in anemia. *Rev. bras.hematol.hemoter*. 2005; 27(3):223-226 <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842005000300018>
40. Stevens MR. Hydroxyurea: an overview. *J Biol Regul Homeost Agents*. 1999;13(3):172-5.
41. Ballas SK, Dover GJ, Charache S. Effect of hydroxyurea on the rheological properties of sickle erythrocytes in vivo. ***Am J Hematol***. 1989;32 (2):104-11.
42. Rhiannon R. Penkert, Julia L. Hurwitz, Paul Thomas, Jason Rosch, Jola Dowdy, Yilun Sun, Li Tang, and Jane S. Hankins. Inflammatory molecule reduction with hydroxyurea therapy in children with sickle cell anemia *Haematologica* 2017. Doi:10.3324/haematol.2017.177360

ANNEXES

Table 1. Characteristics of the groups studied: SCA HU untreated, SCA HU therapy and Control Group

Characteristics	SCA no HU (n=31)	SCA HU (n=24)	Control Group (n=41)	p
Age (Years)	13,20 ± 2,82	11,46 ± 3,49	11,41 ± 3,17	0,054
Gender Male n (%)	17(56,70)	13(54,20)	14(43,10)	0,115
Body Mass Index (Kg/m ²)*	16,85 ± 2,34	16,32 ± 2,22	18,61 ± 3,96	0,013
Z score BMI **	-1,01 ± 0,95	-0,88 ± 1,05	-0,12 ± 1,36	0,005
Peripheral Oxygen Saturation (%)**§	91,29 ± 4,23	95,05 ± 2,52	97,66 ± 0,97	<0,001
Systolic blood pressure (mmHg)	98,75±11,03	96,67±12,11	95,94±10,52	0,261
Diastolic blood pressure (mmHg)	58,75±9,04	53,33±10,32	60,31± 11,89	0,277
Hemoglobin (g/dL) **	7,92 ± 0,79	8,18 ± 0,91	13,12 ± 1,10	<0,001
Fetal Hemoglobin (g/dl)	6,79 ± 5,29	8,64 ± 6,41	—	0,389
Mean Cell Volume (fL)*§	86,86 ± 9,81	94,91±10,61	83,42± 6,78	0,001
Leukocyte Count (× 10 ⁹ /L)**	12,59 ± 3,20	11,68 ± 4,31	7,21 ± 1,53	<0,001
Platelet Count (× 10 ⁹ /L)**	457,92±106,48	469,68±148,42	281,16±47,32	<0,001
Reticulocyte Count (%)**	7,81 ± 5,38	7,28 ± 4,64	0,78 ± 0,24	<0,001
Lactate dehydrogenase(U/L)**§	1356,45±650,16	980,25±432,05	392,57±35,92	<0,001
Aspartate aminotransferase (U/L) **	55,02 ± 21,62	47,24 ± 22,23	23,16 ± 12,28	<0,001
Alanine aminotransferase (U/L) **	27,93 ± 18,47	26,10 ± 16,11	16,79 ± 8,79	0,071
Total bilirubin (mg/dL) **	3,496±2,123	2,955±1,579	0,426±0,261	<0,001

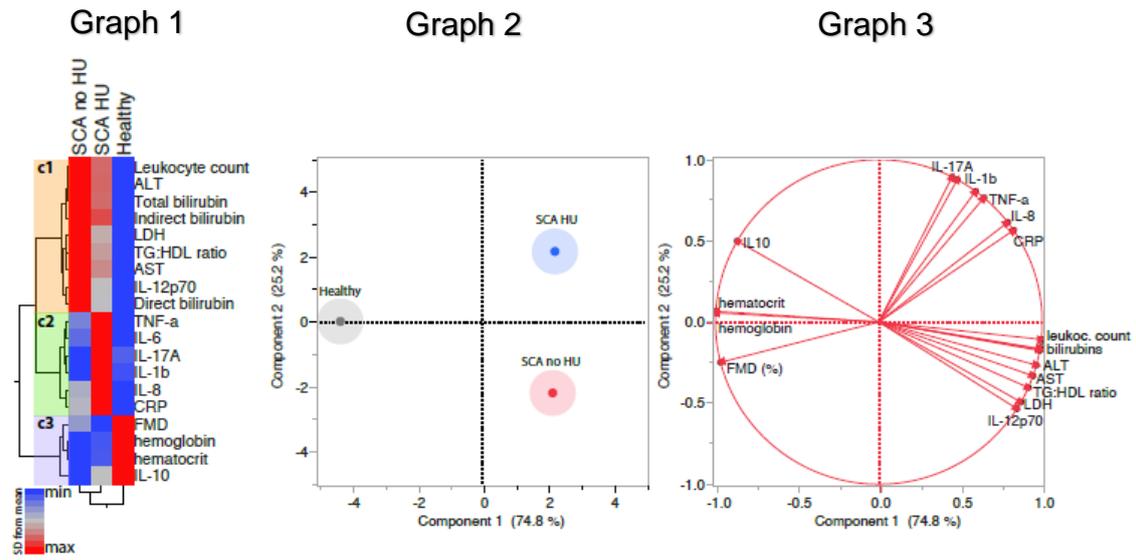
Indirect bilirubin(mg/dL) **	2,74±2,053	2,48±1,58	0,33 ± 0,19	0,001
Direct bilirubin (mg/dL) **	0,87±0,94	0,48±0,32	0,09 ± 0,08	0,008
Glycemia (mg/dL)*	81,44 ± 10,01	79,13 ±10,52	89,47 ± 9,04	0.013
Flow Mediated Dilatation (%)**	10,08 ± 3,84	8,58 ± 4,44	18,21 ± 7,62	0,004

Note: One-way ANOVA and Bonferroni post hoc test for numerical variables with normal distribution. Chi-square for categorical variables. Student t test to compare two independent samples. * Indicates that the difference is between the control group and the SCA HU group. + Indicates that the difference is between the control group and the SCA no HU group. § Indicates that the difference is between the groups with Sickle Cell Anemia.

Tabela 2. Comparison of the lipid profile between sickle cell anemia hydroxyurea untreated group (SCA no HU), SCA HU treated (SCA HU) and control group.

Lipid profile	SCA no HU	SCA HU	Control Group	p
Colesterol total (mg/dl) **	124,23 ± 22,45	114,72 ± 24,63	153,73 ± 26,45	<0,001
LDL-c (mg/dl) **	72,20 ± 22,04	64,34 ± 20,93	90,43 ± 22,52	<0,001
HDL-c (mg/dl) **	31,63 ± 8,64	35,16 ± 18,61	47,03 ± 11,7	<0,001
Triglicérids (mg/dl) +	112,86 ± 51,35	96,93 ± 31,20	74,07 ± 25,87	<0,001
TG/HDL-C**	3,96 ± 2,34	3,22 ± 1,89	1,70 ± 0,83	<0,001

ANOVA test with Bonferroni post hoc test. * Indicates that the difference is between the control group and the SCA HU. + Indicates that the difference is between the control group and the SCA no HU group. LDL (low-density lipoprotein cholesterol); HDL (high-density lipoprotein-cholesterol) TG / HDL-C (Triglycerides / high-density lipoprotein-cholesterol ratio).



Graph 1: Hierarchical cluster analysis between groups treated with HU (SCA HU), HU untreated (SCA no HU) and controls (Healthy) by color scale ranging from intense blue to lower values and intense red to higher values. **Graph 2.** Analysis of the main component. SCA HU (represented in blue), SCA on HU (represented in red) and Healthy (represented in black). **Graph 3.** Vector analysis. It shows the variables that influenced the difference between the groups.