

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ANÁLISE MULTIFATORIAL DOS MODULADORES DA GRAVIDADE DA ANEMIA  
FALCIFORME E A EXPLORAÇÃO RACIONAL DOS PARÂMETROS NA  
ESTRATIFICAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO COMO FERRAMENTA PARA  
PREDIÇÃO DA GRAVIDADE, POTENCIAL DE UTILIDADE CLÍNICA E  
ACESSIBILIDADE À TERAPIA INDIVIDUALIZADA**

IANAÊ INDIARA WILKE

Porto Alegre

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ANÁLISE MULTIFATORIAL DOS MODULADORES DA GRAVIDADE DA ANEMIA  
FALCIFORME E A EXPLORAÇÃO RACIONAL DOS PARÂMETROS NA  
ESTRATIFICAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO COMO FERRAMENTA PARA  
PREDIÇÃO DA GRAVIDADE, POTENCIAL DE UTILIDADE CLÍNICA E  
ACESSIBILIDADE À TERAPIA INDIVIDUALIZADA**

IANAÊ INDIARA WILKE

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2021

*BANCA EXAMINADORA*

*Prof. Dr. João Ricardo Friedrich*

*Prof. Dr. José Arthur Bogo Chies*

*Profa. Dra. Tania Furlanetto*

*Prof. Dr. Marino Bianchin*

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho é a concretização de um sonho...

Agradeço a Deus pai todo poderoso, por todas as bênçãos, ensinamentos divinos e energia emanada;

À minha mãe que é meu porto seguro, por me ensinar o que realmente importa nesta vida, pelos colos, amparos e principalmente por sempre incentivar minhas escolhas, obrigada por nunca soltar minha mão...

Ao meu esposo, Maikon Gomes, por todo apoio quando mais precisei, por ser este parceiro incentivador, que esteve ao meu lado em todos os momentos...

Aos meus irmãos, Juliano e Jacson, pelo amor incondicional e por torcerem por mim mesmo de longe...

À minha orientadora, Lúcia Silla, uma pessoa incrível, que sempre será minha maior inspiração, obrigada por todo carinho e ensinamentos que me fizeram chegar até aqui...

Aos colegas de laboratório pelo companheirismo nessa jornada...

À querida Daniela Richter por ter me acompanhado e não ter soltado minha mão em toda trajetória deste desafio, obrigado por dividir comigo angústias e conquistas, foste essencial nesta trajetória...

Aos pacientes e voluntários que me proporcionaram a realização deste trabalho, espero poder contribuir para melhoria terapêutica de vocês...

À CAPES pela concessão da bolsa...

Gratidão, gratidão e gratidão!!!

" Podemos usufruir das bênçãos de Deus e ser bênção para os outros "

Autor desconhecido

## RESUMO

A anemia falciforme (AF) é hoje a doença genética mais prevalente mundialmente, caracterizada por um alto índice de morbimortalidade e considerada como a mais grave dentre as doenças falciformes. Características genéticas dos indivíduos além da possível heterogeneidade das moléculas associadas à hemólise e vasculopatia são responsáveis por uma variedade de manifestações e complicações clínicas. Embora seja uma patologia monogênica ocasionada por uma única mutação, fatores genéticos e ambientais têm demonstrado um papel fundamental nas variações de gravidade da doença. Atualmente a classificação da patologia se dá através das taxas de crises de dor, com uma abrangência muito restrita para uma doença multifatorial. Diante deste contexto, o estudo teve como objetivo principal a análise multifatorial dos possíveis moduladores da gravidade da Anemia Falciforme e a exploração racional destes parâmetros nos mecanismos reguladores e de danos na estratificação do perfil fenotípico como ferramenta para posterior predição de gravidade e terapia individualizada. Caracteriza-se por um estudo pioneiro do tipo de pesquisa clínica de coorte. Foram incluídos neste estudo 197 indivíduos, dos quais, 65 indivíduos normais sem a patologia, doadores do banco de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), e 132 pacientes homocigotos SS, em acompanhamento médico no Centro de Referência em Doença Falciforme do HCPA, e incluiu uma análise de 97 variáveis. A obtenção de dados se deu através de análise de parâmetros genéticos (polimorfismos e microRNAs), parâmetros laboratoriais (hematológicos e bioquímicos), parâmetros clínicos e análise do perfil inflamatório (citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento). As variantes genéticas foram genotipadas por amplificação de análise de PCR em tempo real, Taqman. Os riscos relativos para o desenvolvimento de cada manifestação clínica da doença e gravidade fenotípica foram calculados para os genótipos em Xmn1-HBG2 (rs7482144); o BCL11A (rs1427407, rs4671393 e rs11886868); e HMIP-2 (rs9399137 e rs9402686) e suas associações foram testadas. Para os microRNAs foram comparadas as diferenças dos perfis de expressão de cada microRNAa com a média do grupo controle, sua associação com os parâmetros clinicopatológicos, correlações entre as variáveis hematológicas e bioquímicas com a finalidade de avaliar a influência entre as variáveis, além do valor prognóstico destes microRNAs para a gravidade da doença, através da curva ROC. Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento foram avaliados através da plataforma Luminex, onde 30 analitos foram medidos simultaneamente (EGF; HGF; VEGF; MIG; RANTES; Eotaxina; IL-8; GM-CSF; TNF alfa; IL-1 beta; IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-10; MIP-

1 alfa; IL-17; MIP-1 beta; IP-10; IFN alfa; IL-7; IL-15; MCP-1; G-CSF; IL-2R; IFN gama; FGF-Basic; IL-1RA; IL-12 e IL-13) e comparados com grupo controle (HbAA). Para testar a hipótese de que níveis sistêmicos destas moléculas poderiam estar associados a variabilidade fenotípica da doença, investigamos as associações com escores de gravidade e aspectos clinicopatológicos. Concluiu-se que 2 locis possuem uma possível relação genética com determinadas manifestações clínicas e níveis de distribuição de HbF e que, a presença de alelos específicos pode atribuir riscos crescentes de complicações clínicas de acordo com a manifestação do alelo no genótipo. Já a análise de microRNAs revelou 3 microRNAs diferencialmente expressos, além de correlações negativas e positivas significativas com os escores de gravidade, apresentando um bom valor prognóstico e ótimo valor preditivo para gravidade da doença. Além disso, nossos resultados mostraram maiores concentrações de citocinas inflamatórias nos pacientes em relação ao controle. E, ao avaliarmos a importância destes moduladores inflamatórios na variabilidade fenotípica, encontramos diferenças estatisticamente expressivas em pacientes que apresentavam um perfil mais grave daqueles com um perfil clínico mais brando. Ao final é apresentado um modelo multivariável de estratificação fenotípica com potenciais preditores de gravidade na tentativa de prever e definir fenótipos na AF, possibilitando um conhecimento do nível de morbimortalidade e direcionamento de novas abordagens terapêuticas individualizadas.

Palavras chave: Anemia falciforme; fatores moduladores; gravidade clínica.

## ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is the most prevalent genetic disease worldwide, characterized by a high morbidity and mortality rate and considered the most serious among sickle cell diseases. Genetic characteristics of individuals and the possible heterogeneity of molecules associated with hemolysis and vasculopathy are responsible for a variety of clinical manifestations and complications. Although it is a monogenic pathology caused by a single mutation, genetic and environmental factors have shown a fundamental role in variations in the severity of the disease. Currently, the pathology classification occurs through the rates of pain crises, with a very restricted scope for a multifactorial disease. Given this context, the study had as main objective the multifactorial analysis of possible modulators of the severity of Sickle Cell Anemia and the rational exploration of these parameters in the regulatory mechanisms and damage in the stratification of the phenotypic profile as a tool for later prediction of severity and individualized therapy. It is a pioneering study of clinical cohort research type. A total of 197 individuals were included in this study, of whom 65 normal individuals without the pathology, donors of the blood bank of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA), and 132 homozygous SS patients, under medical supervision at the Reference Center for Sickle Cell Disease HCPA, and included an analysis of 97 variables. Data were obtained through analysis of genetic parameters (polymorphisms and microRNAs), laboratory parameters (hematological and biochemical), clinical parameters, and analysis of the inflammatory profile (cytokines, chemokines, and growth factors). The genetic variants were genotyped by amplification of real-time PCR analysis, Taq-Man. The relative risks for the development of each clinical manifestation of the disease and phenotypic severity were calculated for the genotypes in Xmn1-HBG2 (rs7482144); BCL11A (rs1427407, rs4671393, and rs11886868); and HMIP-2 (rs9399137 and rs9402686) and their associations were tested. For microRNAs, the differences in the expression profiles of each microRNA were compared with the mean of the control group, its association with clinicopathological parameters, correlations between hematological and biochemical variables to assess the influence between the variables, in addition to the diagnostic value of these microRNAs for the severity of the disease, through the ROC curve. Cytokines, chemokines and growth factors were evaluated using the Luminex platform, where 30 analytes were measured simultaneously (EGF; HGF; VEGF; MIG; RANTES; Eotaxin; IL-8; GM-CSF; TNF alpha; IL-1 beta; IL -2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-10; MIP-1 alpha; IL-17; MIP-1 beta; IP-10; IFN alpha; IL-7; IL-15; MCP- 1; G-CSF; IL-2R; IFN gamma; FGF-Basic; IL-1RA; IL-12 and



IL-13) and compared with the control group (HbAA). To test the hypothesis that systemic levels of these molecules could be associated with phenotypic variability of the disease, we investigated the associations with severity scores and clinicopathological aspects. It was concluded that two loci have a possible genetic relationship with certain clinical manifestations and levels of HbF distribution and that the presence of specific alleles can attribute increasing risks of clinical complications according to the manifestation of the allele in the genotype. MicroRNA analysis revealed three microRNAs differentially expressed, in addition to significant negative and positive correlations with severity scores, presenting a good diagnostic value and excellent predictive value for disease severity. In addition, our results showed higher concentrations of inflammatory cytokines in patients compared to the control. And, when evaluating the importance of these inflammatory modulators in phenotypic variability, we found statistically significant differences in patients who had a more severe profile than those with a milder clinical profile. In the end, a multivariable model of phenotypic stratification with potential predictors of severity is presented in an attempt to predict and define phenotypes in SCA, enabling knowledge of the level of morbidity and mortality and the direction of new individualized therapeutic approaches.

Keywords: Sickle Cell Anemia; modulating factors; clinical severity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Linha do tempo das principais descobertas e eventos significativos na AF.	18
Figura 2: Mecanismo de Vaso-oclusão.	20
Figura 3: Mecanismo de disfunção hemolítico-endotelial.	21
Figura 4: Subfenótipos e eventos clínicos na AF.	23
Figura 5: Papel das intervenções farmacêuticas nos mecanismos patogênicos da AF.	31
Figura 6: Papel dos micrnas na doença falciforme.	37
Figura 7: Múltiplos níveis de regulação das citocinas	41
Figura 8: Estratégia de Busca Bibliográfica.	49
Figura 9: Estratégia de seleção	50
Figura 10: Marco Conceitual	51
Figura 11: Esquematização representativa dos processos, fluxos e ações executadas.	54

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Principais propriedades das Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento.	42
--	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AF – Anemia Falciforme

ALT - Alanina transaminase

AST – Aspartato transaminase

AVC – Acidente vascular cerebral

CT – Threshold cycles

CSSCD – Estudo cooperativo de doença falciforme

DF – Doença falciforme

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FDA - Food and Drug Administration

GWAS – Estudos de associação genômica

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HU – Hidroxiuréia

Hb - Hemoglobina

HbF – Hemoglobina fetal

HbSS – Homozigose para hemoglobina mutante S

HP – Hipertensão pulmonar

ICAM1 – Molécula de adesão intercelular 1

LDH - Lactato desidrogenase

LMO2 – LIM proteína 2

LPS – Lesões pulmonares agudas

MiRNAs – MicroRNAs

mRNA – RNA mensageiro

MYB – Membro da família de fatores de transcrição de mieloblastose

NADH – Coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NALP – NRLP – Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo

NRF2 – Fator nuclear eritróide

ON – Óxido nítrico

PCR – Reação da polymerase em cadeia

QTL - Quantitative trait loci-designados por QTLs

REDOX – Reações de óxido - redução

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reativas de oxigênio

TCTH – Transplante de células tronco hematopoéticas

VCAM1 – Molécula de adesão de células vasculares 1

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>18</b>
2.1 ORIGENS E ETIOLOGIA	18
2.2 A complexa fisiopatologia da anemia falciforme	19
2.3 Complicações na Anemia Falciforme	22
2.3.1 Esplenomegalia	23
2.3.2 Crises álgicas	24
2.3.3 Osteonecrose	25
2.3.4 Colelitíase	25
2.3.5 Acidente Vascular Cerebral	26
2.3.6 Infecções	26
2.3.7 Síndrome Torácica Aguda (STA)	27
2.3.8 Complicações cardiovasculares	28
2.3.9 Hipertensão Pulmonar	28
2.5.1 Marcadores hematológicos	33
2.5.2 Marcadores bioquímicos	34
2.5.3 $\alpha$ talassemia	34
2.5.4 Polimorfismos	35
2.5.5 MicroRNAs	36
2.5.6 Marcadores inflamatórios	39
2.6 MEDINDO A GRAVIDADE DA ANEMIA FALCIFORME	46
<b>3 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES</b>	<b>49</b>
<b>4 MARCO CONCEITUAL</b>	<b>51</b>
<b>5 JUSTIFICATIVA</b>	<b>52</b>
<b>6 OBJETIVOS</b>	<b>53</b>
6.1 OBJETIVO PRIMÁRIO	53
6.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	53
<b>7. FLOWCHART</b>	<b>54</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	<b>55</b>
<b>9 ORIGINAL PAPER</b>	<b>63</b>
ORIGINAL PAPER 1	64

ORIGINAL PAPER 2	86
ORIGINAL PAPER 3	105
ORIGINAL PAPER 4	124
<b>10 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>143</b>
<b>11 PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>143</b>
ANEXO A	144
ANEXO B	146

## 1 INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da Anemia Falciforme (AF) em 1910, diversos estudos têm buscado elucidar a patogênese da doença. Uma mutação de ponto com a substituição de um único aminoácido na cadeia da  $\beta$ -globina é a causa central da doença que vai ocasionar uma desoxigenação com posterior polimerização da hemoglobina, levando a anormalidades na reologia eritrocitária e conseqüente diminuição do seu ciclo de vida. Clinicamente, essas anormalidades se manifestam em crises de vaso-oclusão e anemia hemolítica que levam a uma lesão isquêmica e reperfusão com lesão de órgãos. Este ciclo vicioso de eventos vaso-oclusivos e hemólise intravascular promovem uma inflamação crônica e instabilidades no equilíbrio REDOX (reações de oxido-redução) que levam a vasculopatia progressiva. Este ciclo constante de polimerização da hemoglobina (HbS), biorreologia prejudicada, aumento da adesão mediada por vaso-oclusão, disfunção endotelial mediada por hemólise e ativação da inflamação promovem dor aguda e crônica, lesão e falência de órgãos (1–3).

Apesar da alta morbimortalidade, a tradução e implantação na prática clínica de novas descobertas em novos tratamentos têm sido bastante devagar e, por mais de 30 anos, apenas duas abordagens para a modificação da doença foram amplamente implantadas: a transfusão de sangue e a terapia com Hidroxiuréia (HU) (2). Atualmente não existe um consenso que possa ser utilizado para caracterizar e classificar a gravidade da doença. Embora diversos estudos tenham pesquisado preditores de desfechos e mortalidade, nenhuma estratificação global destes resultados tem sido direcionada para prática clínica, talvez pela complexa fisiopatologia da doença e das variáveis estudadas.

Uma gama de estudos até o momento investigou a relação de parâmetros hematológicos e bioquímicos com a gravidade clínica da AF (4–9). Outros usaram apenas as taxas de crises de dor para avaliar a gravidade da doença (10–12). Mais recentemente um sistema composto por poucas características do paciente, obtidas em visita clínica, foi desenvolvido para um sistema de gravidade (13). Outro modelo de análise proposto de modelagem bayesiana, usou 25 eventos clínicos e testes laboratoriais para estimar a gravidade da doença falciforme (14). Assim, diversos determinantes, modificadores e marcadores de gravidade da doença têm sido alvo de estudos isoladamente (3). Integrar uma gama de variáveis preditoras de gravidade, desenvolver e validar uma medida composta tem sido uma necessidade que poderá elucidar e levar a importantes descobertas de associação. Pois atualmente não existe um sistema de classificação e estratificação aceito para gravidade da doença falciforme.



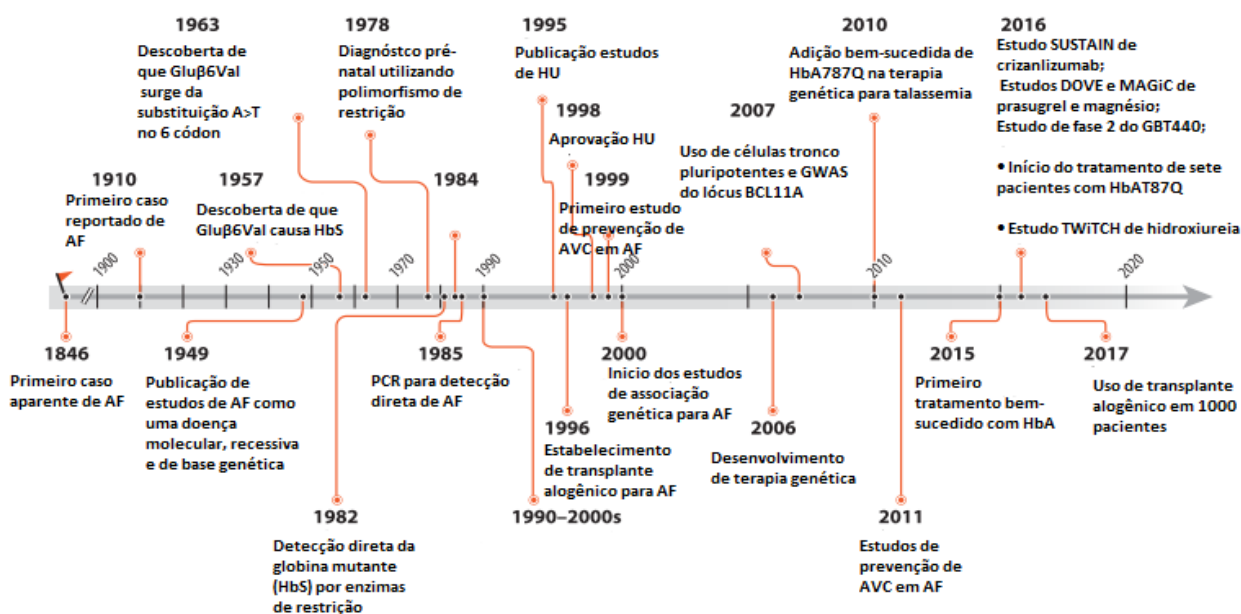
Diante deste contexto, a identificação sistemática de fatores que contribuam para a patologia, juntamente com o estudo e elucidação dos componentes moduladores da gravidade da doença podem oferecer oportunidades de novas perspectivas para exploração racional dos parâmetros nos mecanismos reguladores e danos desta condição fisiológica, possibilitando uma estratificação dos fenótipos com posterior predição da gravidade da doença e utilização clínica para tratamentos individualizados.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ORIGENS E ETIOLOGIA

A AF foi descrita pela primeira vez em novembro de 1910, quando Herrick, um estudante de odontologia da cidade de Granada, relatou um caso de anemia que foi associado a "corpúsculos vermelhos peculiares alongados e em forma de foice" quando observado na microscopia (15). Posteriormente em 1949 foi anunciada como a primeira "doença molecular", quando Pauling *et al.* atribuiu sua base à presença de uma hemoglobina anormal, hemoglobina S (HbS) (16). Sucessivamente, em 1957, Ingram descobriu que a HbS era causada por uma única substituição de aminoácido (ácido glutâmico alterado para valina) na posição 6 da cadeia  $\beta$ -globina da hemoglobina e, seguidamente em 1963, foi demonstrado por Goldstein *et al.*, que essa substituição de aminoácido era proveniente de uma única mudança de base (A > T) no códon 6 (17). Entretanto, a contribuição de uma gama de modificadores, inclusive genéticos, na extrema heterogeneidade clínica tornou a AF um exemplo de doenças com efeitos pleiotrópicos, no qual a herança de um único gene pode condicionar diversas características simultaneamente. Mais recentemente, a AF tem sido considerada como uma doença multifatorial, onde genes modificadores epistáticos além do gene da hemoglobina falciforme, juntamente com as influências ambientais, fatores reguladores de transcrição e inflamatórios interagem para determinar o fenótipo da doença (18). A Figura 1 mostra uma linha do tempo das principais descobertas genéticas e eventos significativos na AF.

Figura 1: Linha do tempo das principais descobertas e eventos significativos em SCA. Adaptado de Williams *et al.* (2018).



Abreviaturas: DOVE: Determinação dos efeitos da inibição plaquetária em eventos vaso-oclusivos; FDA: Food and Drug Administration; Glu $\beta$ 6Val: substituição de valina por ácido glutâmico na posição 6 da cadeia  $\beta$ -globina da hemoglobina; GWAS: estudo de associação do genoma; HbA / F / S: hemoglobina A / F / S; TCTH: transplante de células-tronco hematopoéticas; MAGiC: Magnésio para Crianças em Crise; MSH: Estudo Multicêntrico de Hidroxiureia na Anemia Falciforme; SUSTAIN: estudo para avaliar a segurança e o impacto de SelG1 com ou sem terapia com hidroxiuréia em pacientes com doença falciforme com crises de dor; TWiTCH: Doppler transcraniano com transfusões que mudam para hidroxiureia.

## **2.2 A complexa fisiopatologia da anemia falciforme**

A AF é a hemoglobinopatia mais prevalente no mundo com alta morbimortalidade e considerada como a mais grave dentre as doenças falciformes. Caracterizada como uma doença monogênica hereditária, a AF é definida pela homozigose para mutação do gene da  $\beta$ -globina. Uma mutação pontual com a substituição de uma única base no sexto códon do gene da globina leva a uma substituição do ácido glutâmico pela valina e como consequência a polimerização desta molécula de hemoglobina quando desoxigenada. Apesar de classificada como uma doença monogênica, a AF apresenta-se com uma fisiopatologia complexa, onde a vaso-oclusão e hemólise levam a gravidade das manifestações clínicas que são extremamente variáveis. Dentro deste contexto a HbF tem sido caracterizada como o modulador mais importante das características clínicas e hematológicas da doença, estando associado a uma redução nas manifestações clínicas e episódios mais graves. Uma única mutação de ponto é a causa da AF. Entretanto, o evento principal que leva às consequências fisiopatológicas e à polimerização de HbS em condições de hipóxia vai levar a alterações na estrutura e função dos eritrócitos. Estas alterações por sua vez vão acarretar em uma cascata de eventos que levarão a vaso-oclusão e hemólise (1,2).

A polimerização de HbS em baixas tensões de oxigênio é o evento principal que está por trás das diversas consequências fisiopatológicas, alterando tanto a estrutura como a função dos eritrócitos, sendo responsável por uma cascata de eventos que irão afetar uma gama de tecidos (2).

### **2.2.1 Vaso-oclusão**

A vaso-oclusão da HbS é uma condição que levará a uma desidratação decorrente do influxo de cálcio, que acarretará em um aumento da hemoglobina intracelular exacerbando a polimerização do eritrócito e levando a falcização do mesmo. Estes eritrócitos terão dificuldades ao circular na microvasculatura causando oclusões que levam à hipóxia tecidual

local. Entretanto esta obstrução mecânica local é apenas uma das consequências da polimerização, sua estrutura extremamente frágil leva a uma vida útil destes eritrócitos de em média 16 dias, que acarretará em uma liberação contínua de hemoglobina livre diante da hemólise crônica, esgotando a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) favorecendo a patologia da doença. Outro fator importante é o aumento de neutrófilos apresentado por estes pacientes, que por sua vez são extremamente ativados e parecem desempenhar um importante papel na vaso-oclusão pela sua interação com endotélio e eritrócitos. Outro elemento importante neste contexto é a ativação exacerbada de plaquetas e a expressão de moléculas de adesão por células endoteliais (P e E-selectinas, molécula de adesão intercelular 1 -ICAM-1 e molécula de adesão de células vasculares 1 - VCAM-1), além de uma cascata de citocinas que parecem modular o curso clínico da doença (2).

O subfenótipo vaso-oclusivo está associado a uma alta contagem de neutrófilos, níveis de Hb e hematócrito relativamente mais altos e níveis baixos de HbF. Episódios de dor, síndrome torácica aguda, osteonecrose e lesão renal aguda são as complicações clínicas associadas a este mecanismo (19).

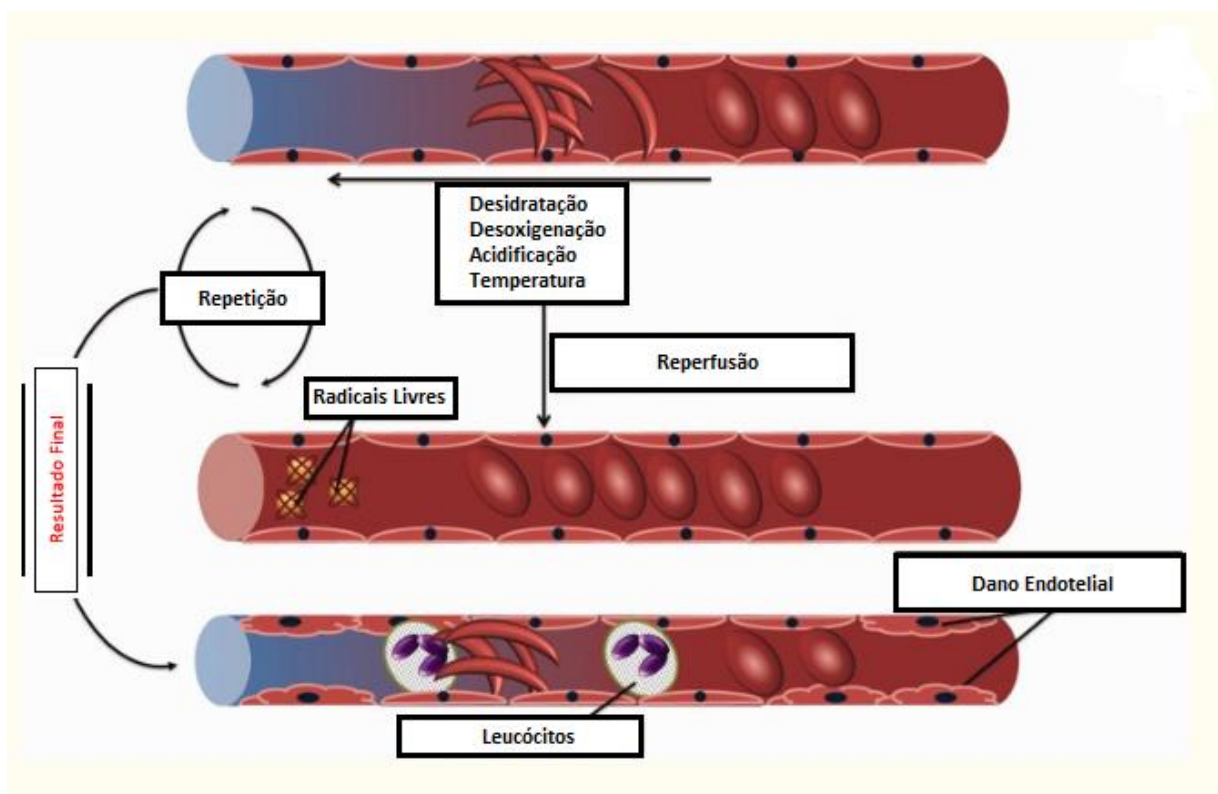


Figura 2: Mecanismo de Vaso-oclusão. Adaptado de Habara & Steinberg (2016)

### 2.2.2 Hemólise

Quando comparada com o mecanismo de vaso-oclusão, a hemólise por muito tempo não era vista como uma medida crítica para gravidade do curso clínico da AF. Entretanto, a homeostase desregulada do óxido nítrico (ON) e adesão de reticulócitos associada às taxas de hemólise parece exercer um importante papel na vasculopatia falciforme. A anemia hemolítica parece fundamentar algumas complicações na AF devido aos seus efeitos sobre a biodisponibilidade do óxido nítrico. Este estado de biodisponibilidade reduzida irá prejudicar funções homeostáticas vasculares como a inibição da ativação e agregação plaquetária, repressão transcricional de moléculas de adesão. Além disso os eritrócitos lisados vão liberar arginase, que conseqüentemente destrói L-arginina que é um substrato na produção de ON, além do heme, hemoglobina livre e o ferro catalisam a produção de radicais de oxigênio que vai acarretar em uma biodisponibilidade ainda menor de ON (20).

O subfenótipo hemolítico está associado a marcadores de hemólise como baixos níveis de Hb e hematócrito, altos níveis de Hb plasmática livre, LDH, AST, bilirrubinas, alta contagem de reticulócitos, níveis aumentados de moléculas de adesão solúveis e intercelular.

Apesar do curso clínico da doença ser caracterizada em duas fisiopatologias mecanicistas (vaso-oclusão e hemólise) os subfenótipos da doença não são completamente distintos. A hemólise pode desencadear vaso-oclusão, contribuindo para o desenvolvimento de complicações vasculares (19). Foi postulado que uma variação no grau de hemólise apresentado por estes pacientes pode contribuir para a heterogeneidade fenotípica da doença.

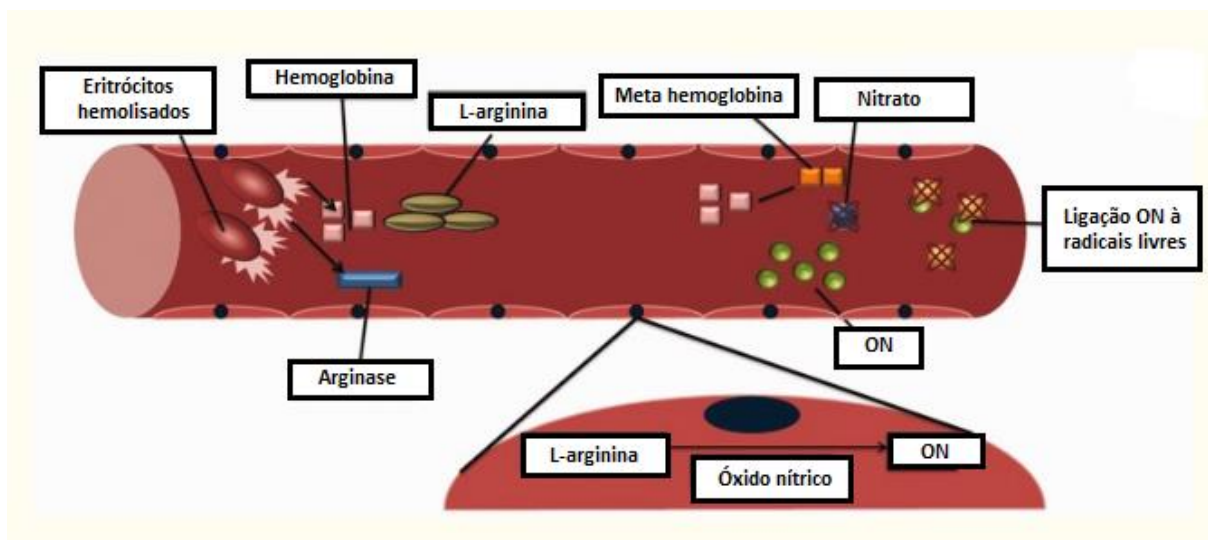


Figura 3: Mecanismo de disfunção hemolítico-endotelial. Adaptado de Habara & Steinberg (2016).

### 2.3 Complicações na Anemia Falciforme

A heterogeneidade clínica da AF ainda não é bem compreendida (21). Dada a complexa fisiopatologia, compreender a gravidade clínica tem sido um desafio. As manifestações clínicas se desenvolvem à medida que a síntese das cadeias de globina tem sua substituição de  $\gamma$  para  $\beta$  aumentando os níveis de HbS. Esta transição por sua vez, ocorre em tempos distintos nos indivíduos, podendo desenvolver as primeiras complicações em um intervalo de tempo de 2 a 3 meses após o nascimento (22). As primeiras manifestações incluem dactilite, esplenomegalia, síndrome torácica aguda (STA) e acidente vascular cerebral (AVC) nos primeiros anos de vida. Ao final da infância e na adolescência observa-se um aumento e prevalência de crises de dor óssea, osteonecrose, úlceras de perna, priapismo, problemas de retardo de crescimento. Já na vida adulta o AVC tem seu segundo pico por volta dos 25 anos de idade, com uma característica predominantemente hemorrágica. A STA também permanece com um aumento da fibrose pulmonar podendo associar-se ao desenvolvimento de hipertensão pulmonar, aumentando também a pressão sobre a função cardíaca, evoluindo para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva. Com o aumento da idade, complicações crônicas de órgãos prevalecem, principalmente com o desenvolvimento de complicações cardiopulmonares e renais (22,23).

As manifestações clínicas AF estão diretamente relacionadas com alterações que iniciam no campo molecular e se estendem a nível celular, tecidos e órgãos, caracterizando-a como uma doença multissistêmica. Estudos têm evidenciado os subfenótipos de vaso-oclusão e hemólise como incitador de algumas características fisiológicas e uma divisão da fisiopatologia em dois âmbitos inter-relacionados parecem evidenciar o mecanicismo do curso clínico, apesar destes eventos poderem ocorrer simultaneamente (figura 3) (20).

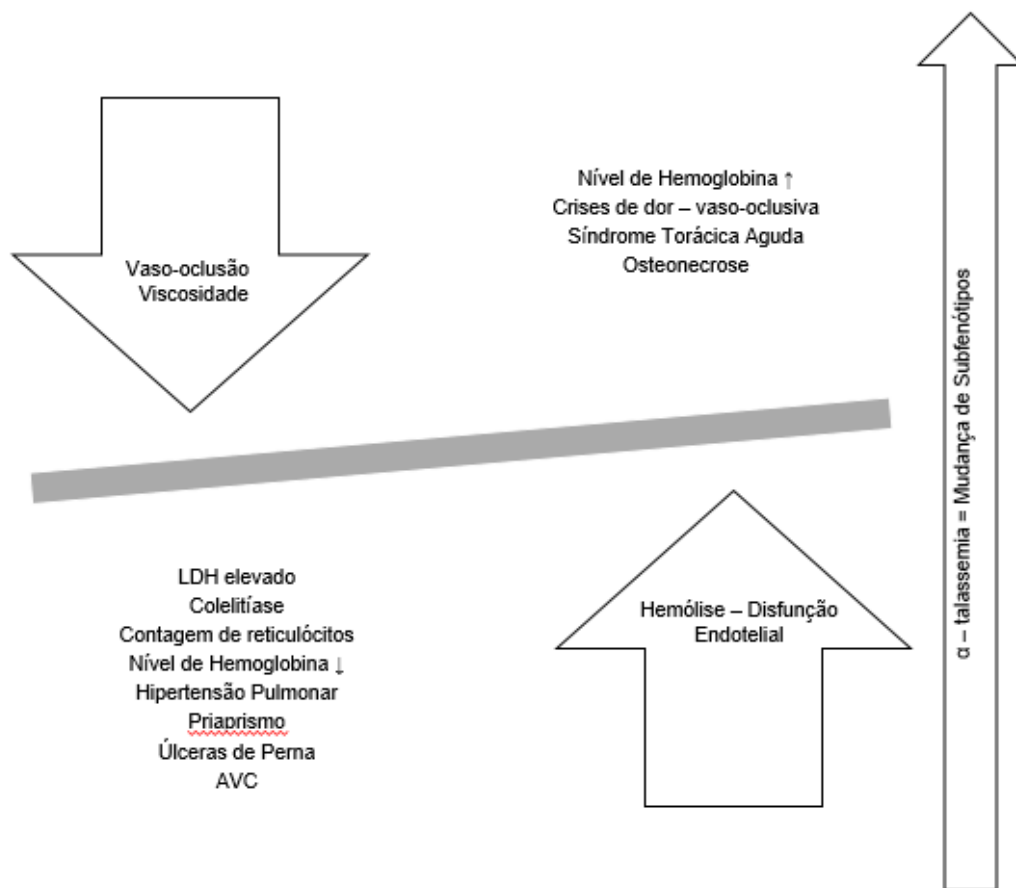


Figura 4: Subfenótipos e eventos clínicos na AF. Adaptado de Kato (2007)

### 2.3.1 Esplenomegalia

A crise de sequestro esplênico agudo é uma complicação da doença falciforme com risco de vida, caracterizada por aumento esplênico agudo e uma queda rápida nos níveis de hemoglobina, que ocorre normalmente entre os seis meses de vida até os cinco anos de idade (24). E embora seja uma doença predominante de crianças, casos raros foram relatados em adultos com AF (25,26). Apesar de a co-hereditariedade, a presença de traço de talassemia alfa e a presença de outras formas heterozigóticas da doença falciforme serem atribuídas a persistência da esplenomegalia, estudos têm descrito a esplenomegalia com uma prevalência de 12% a 73% entre crianças e 4% a 50% entre adultos com HbSS (27).

Presume-se que tal evento seja decorrente da obstrução mecânica dentro do baço provocada pelos eritrócitos falciformes. E à medida que esse evento oclusivo ocorre leva a uma queda brusca de hemoglobina e consequente aumento do baço (24). A restauração do volume

sanguíneo circulante através da transfusão de hemácias proporcionará uma melhora do nível de hemoglobina além da liberação de hemácias presas no baço. Outras medidas como fluidos intravenosos, terapia de transfusão programada e a esplenectomia são medidas adotadas no manejo a longo prazo. Entretanto, muitas das complicações desenvolvidas a longo prazo por estes pacientes são decorrentes destas medidas que buscam minimizar a recorrência deste evento (24). O baço desempenha um papel fundamental na imunidade com a produção de anticorpos e controle de qualidade dos eritrócitos, sendo o primeiro órgão a ser lesado na AF é fundamental para morbimortalidade em crianças com esta hemoglobinopatia (28,29). A esplenectomia por sua vez vai acabar levando a um maior risco no desenvolvimento de infecções, além disto a transfusão programada leva ao risco de uma sobrecarga de ferro e imunização, trazendo problemas para um perfil adequado de futuros doadores (24,30). Hankins *et al.* (2005) estudaram sobre os efeitos da terapia com hidroxiuréia em crianças com doença falciforme e revelou que uma taxa muito menor de pacientes asplênicos após quatro anos de terapia (43%) sugerindo que esta terapia pode prevenir a ocorrência de tal manifestação (31).

O sequestro esplênico é uma manifestação clínica grave que se não diagnosticada e tratada precocemente pode levar a um colapso hemodinâmico. E dentro deste contexto que se ressalta a importância de uma ferramenta para predição da gravidade nestes pacientes com potencial utilidade clínica através de parâmetros de estratificação fenotípica que levem a uma terapia individualizada.

### 2.3.2 Crises álgicas

A crise álgica é uma das comorbidades mais frequentes na AF. Pacientes com esta patologia desenvolvem dor aguda e crônica, que parece ser ocasionada por episódios recorrentes de crises vaso-oclusivas, geralmente resultante da necrose avascular da medula óssea (22,32). Tal evento pode ter início desde a infância se estendendo e aumentando sua intensidade na vida adulta. Estudos apontam que mais de 55% de pacientes com AF sentem dor em mais de 50% dos dias de sua vida e 29% relatam sentir em mais de 95% dos dias, provocando consequências impactantes na vida destes indivíduos, diminuindo severamente a qualidade de vida (33). Entretanto causas multifatoriais são estudadas na agregação e aderência de células como hemácias, plaquetas e neutrófilos que desencadeiam uma oclusão da microcirculação com consequente crises álgicas, caracterizadas por dor intensa que impactam diretamente na qualidade de vida de pacientes com AF. A partir da falcização dos eritrócitos



uma cascata de eventos irá desencadear episódios de dor recorrentes. Em condições de hipóxia ocorre a deformação e danos da membrana da hemácia, que acarretará em hemólise resultando na liberação de hemoglobina livre, ferro, além estresse oxidativo. Este cenário por sua vez proporcionará inflamação com ativação de células endoteliais, neutrófilos e plaquetas por meio da liberação de diversos fatores e sinalização do inflamassoma NALP (NRF2) que levará a adesão destas células no endotélio, resultando na vaso-oclusão. A adesão microvascular por sua vez levará a isquemia-reperfusão, levando uma maior ativação da cascata inflamatória e oclusão, propagando episódios oclusivos recorrentes (34,35).

### 2.3.3 Osteonecrose

A osteonecrose é uma complicação esquelética caracterizada como uma lesão óssea isquêmica atribuída a lesões repetidas de isquemia-reperfusão de superfícies articulares que levam a uma gama de problemas articulares degenerativos (36). Os eventos de vaso-oclusão recorrentes na fisiopatologia da AF comprometem o fluxo sanguíneo para as articulações desencadeando eventos de osteonecrose multifocal. Sendo as cabeças femorais e umerais os locais mais comuns de osteonecrose. Estima-se que 20 a 50% dos adultos com AF desenvolvam osteonecrose da cabeça femoral aos 35 anos (37,38). Apesar desta manifestação poder afetar pacientes em qualquer idade, tem sido evidenciado uma pré-disposição em homens adultos jovens com idade média variável na literatura entre 26 e 37 anos (37).

A interrupção da remodelação óssea saudável é a principal causa da ocorrência de osteonecrose na população falciforme, sendo observada em crianças a partir de cinco anos de idade com uma incidência crescente com o aumento da idade e com pico no início da idade adulta nestes pacientes. Crises algícas ocasionadas pela vaso-oclusão tendem a mascarar o diagnóstico de osteonecrose precoce, contribuindo para uma evolução da doença (38).

### 2.3.4 Colelitíase

A colelitíase é um transtorno hepatobiliar relacionado à hemólise. A lise dos eritrócitos falciformes e a degradação da heme resulta em hiperbilirrubinemia que leva a colelitíase em um número bem expressivo de pacientes com AF (39). Com uma incidência assintomática na maioria dos pacientes afetados, estes indivíduos irão apresentar um risco elevado de complicações clínicas que incluem cólica biliar, colicistite, angite e pancreatite (40). Observada

em 70% dos adultos com AF com mais de 30 anos, a frequência deste evento aumenta com a idade apresentando uma maior incidência em pacientes portadores de quadros clínicos com hemólise exacerbada. Destes, 50% irão desenvolver complicações dentro de 3 a 5 anos após o diagnóstico. Até o momento não há diretrizes para o manejo da colelitíase assintomática. Quando sintomática, colecistectomia é o tratamento de escolha. Entretanto, a cirurgia pode levar a ocorrência de diversos fatores que precipitam a falcização dos eritrócitos, desencadeando uma crise hemolítica grave com uma mortalidade de 25% nestes pacientes (41).

### 2.3.5 Acidente Vascular Cerebral

Eventos cerebrovasculares representam uma complicação clínica importante no curso clínico da AF. Com uma incidência muito elevada, as consequências são graves e vão desde o aspecto socioeconômico, redução de qualidade de vida, déficits cognitivos até o aumento da mortalidade em pacientes mais jovens. Sua fisiopatologia tem como principais mecanismos as anormalidades de coagulação juntamente com a disfunção endotelial. A hemólise dos eritrócitos falciformes libera hemoglobina e heme intravascular que irão promover um estado de estresse oxidativo com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e redução de óxido nítrico. Esta diminuição de ON juntamente com a produção de ROS irá propiciar uma proliferação de células que levarão a uma remodelação vascular. Esta resposta vasodilatadora será prejudicada induzindo a expressão de moléculas de adesão por células endoteliais e sanguíneas. O aumento da expressão destas moléculas resultará na ativação de leucócitos, plaquetas e monócitos com consequente adesão e agregação, levando a formação de trombos. Além disto, a ativação destas células promoverá a produção de mediadores inflamatórios que irão levar a uma resposta inflamatória crônica. A obstrução vascular ocasionada por esta disfunção endotelial juntamente com o alto débito cardíaco vai levar a um aumento no fluxo de sangue cerebral intenso no qual os mecanismos do sistema nervoso central não conseguem compensar, levando ao comprometimento da capacidade vasodilatadora, levando a uma redução do suprimento de oxigênio, hiperviscosidade do sangue e a disfunção dos vasos (42–45).

### 2.3.6 Infecções

A infecção é um fator importantíssimo na morbimortalidade da AF. Um aumento na predisposição a infecções é uma característica clínica da doença provocada por alterações

fisiopatológicas como a função esplênica prejudicada, defeitos na ativação do complemento, deficiência de micronutrientes, além de fatores genéticos e mecânicos. O baço é o principal responsável por filtrar os patógenos circulantes e promover as funções imunes inatas e adaptativas, tendo um papel fundamental na suscetibilidade a infecções relacionadas à AF. Com sua função prejudicada, o seu papel de filtrar e fagocitar células velhas, danificadas e microrganismos, além da produção de anticorpos fica totalmente comprometida. Já o sistema complemento abrange proteínas que quando clivadas geram fragmentos de ativação para opsonização ou quimiotaxia responsáveis pela eliminação de patógenos, defeitos na ativação deste sistema proporciona mais um fator de predisposição para infecções. Em conjunto com estes fatores, a deficiência de micronutrientes também ocasionada pela fisiopatologia da doença leva ao déficit de nutrientes importantes para função imunológica, como o zinco. Outro fator importante é o genético, polimorfismos em uma série de genes vinculados a resposta imunológica tem contribuído para uma maior suscetibilidade a infecções na AF. E, por fim, os fatores mecânicos como a osteomielite, onde áreas deste osso necrótico acabam se tornando focos de infecção que podem se propagar levando a sepse. A STA é outra condição mecânica que proporciona um maior risco de infecções respiratórias graves (46,47).

### 2.3.7 Síndrome Torácica Aguda (STA)

O resultado de vários eventos desencadeados pela vaso-oclusão na vasculatura pulmonar de pacientes com AF resultarão na STA. A necrose da medula óssea e a isquemia que são resultantes da vaso-oclusão são características que resultam na liberação de gordura na circulação venosa, que poderão então migrar para os pulmões e desencadear vaso-oclusão (embolia pulmonar) e conseqüentemente STA. Além disso, outros fatores podem levar a STA na AF, como infecções, que em crianças costumam ser o fator principal, hipoxemia, sedação excessiva pelas crises de dor ou até mesmo condições pós-operatórias. Caracterizada como a doença pulmonar aguda mais comum em pacientes com doença falciforme dentre as inúmeras complicações que podem levar a uma morbimortalidade significativa, a STA é a principal causa de mortalidade nestes indivíduos. A maior incidência ocorre entre 2 a 4 anos nestes pacientes, entretanto na idade adulta em torno de 78% da STA ocorrerá secundariamente a episódios de dor vaso-oclusiva (48,49).

### 2.3.8 Complicações cardiovasculares

As complicações cardiovasculares oriundas da AF possuem uma gama de fatores causadores. Os principais distúrbios cardiovasculares na DF são disfunção ventricular esquerda e a hipertensão pulmonar (HP), sendo os principais causadores das mortes relacionadas a AF (50). A anemia hemolítica induz a um estado de alto débito cardíaco como um mecanismo de compensação para atender a demanda metabólica do corpo oriunda da capacidade reduzida de transporte de oxigênio, ocorrendo então uma remodelação cardíaca adaptativa. A anemia crônica leva a uma importante dilatação vascular periférica, e com uma consequente pressão arterial baixa ocorre uma estimulação do sistema nervoso simpático com a retenção de sal e água nos rins, aumentando o volume do plasma que leva a alterações nas estruturas ventriculares com um débito cardíaco aumentado e dilatação da cavidade do ventrículo associado a hipertrofia miocárdica compensatória que busca normalizar esse estresse sistólico. Entretanto, vários mecanismos podem levar a uma remodelação cardíaca desadaptativa e insuficiência cardíaca. Quando a sobrecarga de volume que induz a remodelação cardíaca morfológica não é mais tolerada, este volume pode levar a danos no miocárdio progressivos. Além disto a disfunção microvascular ocasionada por repetidos eventos vaso-oclusivos juntamente com a eliminação de óxido nítrico contribui para uma alteração da função cardíaca (51).

### 2.3.9 Hipertensão Pulmonar

A hipertensão pulmonar (HP) é um dos principais fatores de risco para morte precoce na AF, afetando cerca de 30% dos indivíduos com esta patologia. Embora estudos tenham demonstrado que pacientes com AF apresentam uma pressão pulmonar menor e um débito cardíaco maior quando comparados a pacientes com HP primária, a taxa de mortalidade por esta complicação é de 50% (52). Marcadores de hemólise, como bilirrubina alta, Hb total baixa e níveis de LDH estão diretamente relacionados à prevalência e gravidade da HP (20).

## 2.4 Tratamentos

A anemia falciforme não tem cura e está associada a complicações potencialmente fatais, com uma expectativa de vida extremamente curta comparado a uma população saudável

(53). Ainda não há um tratamento clínico específico para AF. Os tratamentos existentes atualmente consistem em amenizar as manifestações clínicas e reduzir o número de crises para uma melhor qualidade de vida destes pacientes. Neste contexto, o mesmo se baseia em medidas gerais e preventivas. O manejo da doença até 1998 se baseava em transfusões e terapias para a dor, até a aprovação da HU com base na patogênese molecular que por décadas era o único medicamento aprovado pela FDA. Com avanço na elucidação do mecanismo fisiopatológico da doença novos medicamentos foram surgindo (54). Os avanços na terapia estão proporcionando uma melhor qualidade de vida e prolongando a sobrevida destes pacientes. O manejo do curso clínico da doença pode ser dividido em dois grupos: A prevenção e manutenção da saúde e o manejo das complicações clínicas. O objetivo da manutenção da saúde é justamente rastrear, identificar e prevenir os fatores de risco para estes pacientes no qual cita-se a vacinação pneumocócica, a profilaxia com penicilina, e rastreamentos de rotina com Doppler transcraniano. Já o gerenciamento das complicações é dependente da manifestação apresentada e da gravidade da mesma. Tais como terapia analgésica, hidratação, antibioticoterapia, anti-histamínicos, e transfusão sanguínea (53,55).

A transfusão sanguínea tem sido um elemento fundamental no manejo das complicações clínicas da doença. Porém as complicações decorrentes desta terapia tais como sobrecarga de ferro, reações hemolíticas à transfusão decorrentes de aloimunização com anticorpos sobre as hemácias, além de infecções, são imensas e podem levar à dificuldade na obtenção de produtos sanguíneos adequados, morbidades e até mesmo à morte (2).

Dentre as modalidades curativas encontra-se o transplante de medula óssea, onde a medula que produz os eritrócitos falciformes é substituída por uma medula funcional que produz eritrócitos normais, sendo o único tratamento que proporciona uma possibilidade de supressão do mecanismo de falcização e suas consequências clínicas. No entanto, riscos oriundos do procedimento como o risco aumentado de rejeição do enxerto, a limitação da disponibilidade de doadores compatíveis e o alto índice de mortalidade em contrapartida com os benefícios devem ser analisados (54,56). Outra modalidade que prenuncia um potencial de cura para esta patologia é a terapia genética. A introdução de genes anti-falciformes através da adição gênica, ou por indução de HbF por meio de silenciamento de repressores dos genes da gama globina ou até mesmo pela correção da mutação falciforme por meio de ferramentas de engenharia genômica como Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / Cas9 (54).

As terapias utilizadas atualmente permanecem limitadas a Hidroxiureia (HU), transfusão e transplante de células tronco e mais recentemente a glutamina. Entretanto, a terapia com HU tem sido a mais eficaz no manejo das complicações da doença. HU juntamente com a glutamina, crizanlizumab e voxelotor são os únicos medicamentos aprovados atualmente pela FDA para o tratamento da AF. Até 2017, HU era o único tratamento de SCD farmacológico modificador da doença aprovado pela FDA (54).

A Hidroxiuréia foi o primeiro medicamento aprovado pela FDA. Apresenta-se como um inibidor da ribonucleotídeo redutase inibindo a replicação do DNA. Seu mecanismo de ação ainda não é completamente conhecido, entretanto a sua ação sobre a indução da hemoglobina fetal (Hb F) mostrou-se promissora ao inibir a polimerização da Hb S intracelular e prevenir a falcização das hemácias. Além do aumento da síntese de Hb F e diminuição da polimerização de Hb S, os efeitos incluem aumento da síntese de Hb, diminuição da contagem de neutrófilos, da hemólise, dos danos à membrana das hemácias, além da diminuição da ativação e adesão de células endoteliais (54,57).

A glutamina é um aminoácido precursor da síntese de glutathione, sendo hipotetizada sua ação protetora dos glóbulos vermelhos falciformes ao dano oxidativo. O mecanismo de ação da L-glutamina na AF também não é totalmente compreendido, porém foi evidenciado seu potencial no aumento do NADH nos eritrócitos falciformes, reduzindo o estresse oxidativo. Seu uso foi recentemente aprovado pelo FDA (*food, drug and administration*) para pacientes com idade igual ou superior a 5 anos com base em um estudo de fase 3 que demonstrou uma diminuição significativa nas hospitalizações por crises agudas nesta população (54,55).

O Crizanlizumab é um anticorpo monoclonal que tem sido explorado pelo potencial de inibição de moléculas de adesão, evitando a vaso-oclusão induzido por hipóxia. Um estudo de fase 2 mostrou uma diminuição de eventos vaso-oclusivos ou até mesmo um atraso no desenvolvimento destes eventos quando comparado com placebos (58). Recentemente (2020), o registro para uso do crizanlizumabe foi aprovado no Brasil para pacientes acima de 16 anos.

Outro medicamento aprovado recentemente (2019) para manejo das complicações clínicas pela FDA foi o voxelotor para pacientes adultos e pediátricos de 12 anos de idade ou mais com doença falciforme. Voxelotor é um inibidor da polimerização de HbS e sua atuação

se dá na modificação da afinidade entre a Hb e o oxigênio. A formação de uma ligação covalente (de natureza reversível) com o aminoácido valina localizado no terminal N da cadeia  $\alpha$  da Hb, resulta na modificação alostérica da Hb aumentando a afinidade entre o oxigênio e a Hb (59,60).

Novos agentes farmacológicos estão sob investigação. E dentro deste contexto, encontra-se o rivipansel que é um inibidor da pan-selectina, uma molécula que bloqueia a atividade das moléculas de adesão celular chamadas selectinas nos vasos sanguíneos (55).

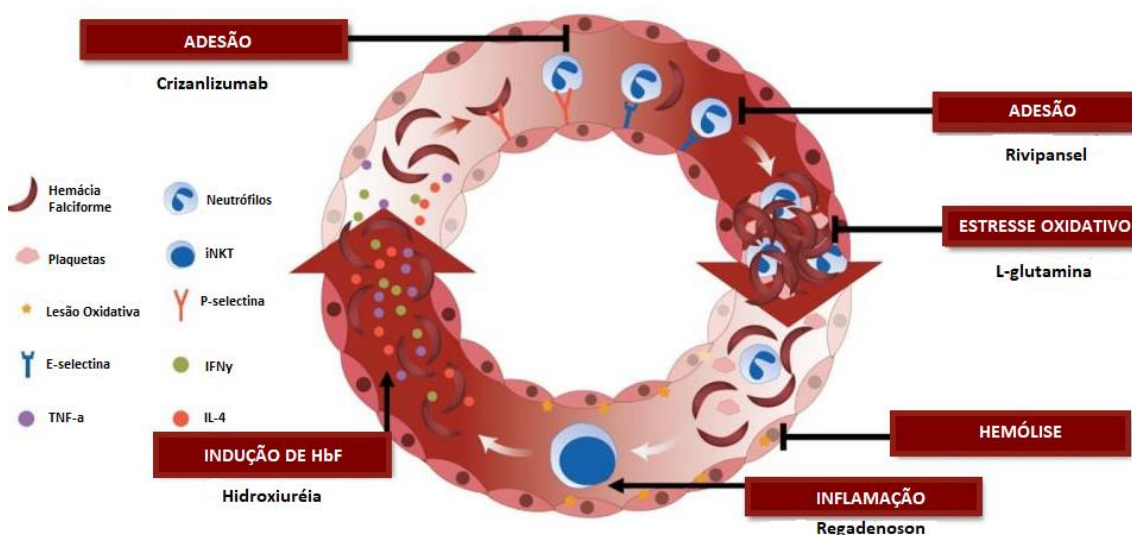


Figura 5: Papel das intervenções farmacêuticas nos mecanismos patogênicos da AF. Adaptado de Field 2015.(61)

Dado que a abordagem clínica atual para a AF tem sido dependente de medidas que buscam uma melhora na qualidade de vida destes pacientes com cuidado de suporte de Hidroxiuréia, as terapias gênicas têm sido uma proposta promissora de potencial cura para a patologia. Nos últimos anos esforços têm sido aplicados na busca por terapias gênicas que possibilitem uma transferência eficiente e segura de genes com uma correção na produção de células hematopoiéticas que possibilite a volta de uma produção de células normais. Tais tentativas deram início com a busca por vetores retrovirais e lentivirais que expressassem  $\beta$ -globina, entretanto tal abordagem resultou em pouca ou nenhuma  $\beta$ -globina após reconstituição hematopoiética. Posteriormente descobriu-se que a variação de expressão está sujeita a um silenciamento por potentes elementos regulatórios como os microRNAs. Além de vetores que promovessem a expressão de  $\beta$ -globina, outros vetores com genes de globina alternativos foram desenvolvidos sob a perspectiva de que possuíam um maior poder de anti-falcização, como g-

globina além de  $\beta$ -globina modificada que seria capaz de conferir resistência à polimerização da hemoglobina. Entretanto as abordagens individuais em termos de carga genética e regulação são uma limitação neste campo (56).

Por sua vez, a engenharia de genoma trouxe uma nova opção na busca pela cura da doença. Nucleases direcionadas irão possibilitar uma clivagem do DNA que permitirão a introdução de quebras de fita dupla específicas em determinado local do genoma humano. A cas9 por exemplo utiliza-se de RNA para guiar o reconhecimento da sequência alvo. Além da possibilidade de correção do gene específico no local da mutação que causa a AF. A possibilidade de produzir modificações previsíveis podem proporcionar futuras terapêuticas promissoras para a doença (62–64).

## **2.5 Biomarcadores candidatos a moduladores da gravidade da AF**

Predizer variações na gravidade da doença falciforme tem sido um desafio. Fatores primários que levam a polimerização da HbS, tais como concentração de HbF e coexistência de  $\alpha$  talassemia tem efeito direto sobre os fenótipos da doença. Estudos de associação têm focado e evidenciado muito o papel da indução de HbF para melhora clínica destes pacientes. Entretanto, apesar de HbF modular alguns subfenótipos e ser considerada como o principal modulador do curso clínico da doença, a heterogeneidade fenotípica da doença parece ser parcialmente explicada pela variabilidade de expressão de HbF e associação com  $\alpha$  talassemia. Fatores subjacentes parecem condicionar a gravidade clínica e o desenvolvimento de determinadas manifestações (65).

O estudo de biomarcadores individualmente tem se mostrado útil no entendimento dos diferentes mecanismos que inter-relacionados possam explicar a heterogeneidade fenotípica da doença. Marcadores de hemólise, hipercoagulabilidade, inflamação, estresse oxidativo, dentre outros detém uma contribuição fundamental nas manifestações clínicas e consequente subfenótipos na AF (65). Diante deste contexto, a necessidade de uma estratificação fenotípica com potenciais biomarcadores de gravidade e de prognóstico do curso clínico da doença poderá proporcionar uma ferramenta com potencial utilidade clínica e redirecionamento de terapias.



### 2.5.1 Marcadores hematológicos

É sabido que a polimerização da HbS desoxigenada é o principal mecanismo na fisiopatologia da AF que desencadeia um curso clínico bastante heterogêneo. Apesar do papel e da taxa desta polimerização ainda não ter sido evidenciada como fator preditor da diversidade fenotípica da AF, a taxa de polimerização nestes indivíduos é diretamente proporcional às quantidades de HbS nos eritrócitos. Assim, a HbF e a coexistência de  $\alpha$  talassemia são dois biomarcadores já bastante discutidos na literatura com a capacidade de alterar estas concentrações de HbS, podendo então ser úteis em uma análise da dimensão desta polimerização (65,66).

A HbF hoje é o modular predominante mais bem estabelecido nos fenótipos da AF. Os níveis de HbF estão fortemente associados a menos complicações associadas à vaso-oclusão e viscosidade do sangue, como episódios dolorosos agudos, STA e osteonecrose. E apesar de ser considerada com um regulador central das características clínicas da doença, não se tem evidenciado associações dos níveis de HbF com complicações associadas à gravidade da hemólise intravascular (67). É sabido que a taxa HbF é um dos moduladores que possui maior influência em diversas complicações na fisiopatologia da AF (68). Apesar de a HbF ter sido a estratégia mais utilizada atualmente e eficaz para modulação das manifestações clínicas e gravidade da doença, a maioria dos estudos de associação de genes candidatos a subfenótipos não inclui SNPs da HbF (69,70). Já a  $\alpha$  talassemia regula a anemia falciforme reduzindo a taxa de polimerização, diminuindo assim as concentrações intracelulares de HbS. Os riscos ou benefícios proporcionados por esta co-herança são oriundos dos efeitos da  $\alpha$  talassemia na hemólise celular (5,65,66).

Outro biomarcador importante na fisiopatologia da doença é a contagem de leucócitos totais. Uma contagem substancialmente elevada é característica da doença, que pode ser útil no prognóstico de gravidade clínica da doença e eventos clínicos como crises álgicas, AVC, STA e até mesmo a morte. Já a Hemoglobina total é um biomarcador associado a eventos clínicos imprevisíveis devido à sua capacidade de predizer AVC e morte. Altos níveis de hemoglobina estão diretamente relacionados com o estado de hiperviscosidade sanguínea, sendo uma via predominante para vaso-oclusão. Os glóbulos brancos por sua vez têm sua contagem

diretamente relacionada com a hiper adesão celular. Ainda dentro deste contexto a contagem de reticulócitos é um biomarcador que se correlaciona com a sobrevida das hemácias (5,65,66).

### 2.5.2 Marcadores bioquímicos

Em pacientes com AF, os níveis séricos de lactato desidrogenase (LDH) tendem a estar elevados, devido a eritropoiese com morte prematura dos eritrócitos juntamente com outros eventos que envolvem o aumento da incidência de apoptose, estando relacionado com um aumento da anemia nestes pacientes (5,66). A aspartato transaminase (AST) é outra alteração bioquímica comum na AF sendo liberada via hemólise intravascular. A relação de AST e ALT pode ser útil como biomarcador hemolítico visto sua associação inversamente proporcional com o nível de hemoglobina. Indivíduos com AF tendem a ter níveis mais elevados de AST devido a natureza hemolítica da fisiopatologia. Já a creatinina sérica tem seu potencial como biomarcador na insuficiência renal de pacientes com AF. E por fim a sobrevida menor dos glóbulos vermelhos vai fazer com que o fígado tenha uma carga aumentada de bilirrubina para depuração hepática (71).

### 2.5.3 $\alpha$ talassemia

A coexistência de  $\alpha$  talassemia é uma condição que resultará na diminuição de HbS intracelular juntamente com concentrações médias de hemoglobina, com conseqüente redução da polimerização e células falciformes. São evidentes alterações hematológicas e laboratoriais na coexistência de  $\alpha$  talassemia quem incluem aumento na vida útil do eritrócito, uma maior concentração de hemoglobina, menor VCM, menor reticulocitose, e menores níveis de bilirrubina e de LDH (67). Tais características propiciam a estes pacientes um risco reduzido de complicações relacionadas à hemólise, porém um risco aumentado de complicações de subfenótipo vaso-oclusivo. Além disto, a co-herança de  $\alpha$  talassemia influencia diretamente na resposta de terapia com HU, principalmente por afetar diretamente os níveis de HbF e o VCM (2).

Assim, apesar da ampla variedade de níveis anormais de biomarcadores hematológicos, e bioquímicos identificados até o momento, nenhum deles isoladamente é capaz de fornecer

informações prognósticas para o manejo do curso clínico da doença. Tais medidas atualmente têm sido a principal ferramenta para diagnóstico e amenização das complicações da doença.

#### 2.5.4 Polimorfismos

Estudos de associação do genoma (GWAS) têm sido amplamente utilizados para buscar associações genéticas, normalmente de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), com o curso clínico da doença (72–81). Tais estudos têm sua importância na melhoria do prognóstico e identificação de variáveis que possam levar a terapêuticas com alvos promissores (21).

Quando um polimorfismo é associado a um determinado fenótipo, o mecanismo pela qual a doença sofre influência é desconhecido. Isto ocorre porque muitas variantes estão localizadas em DNA ou RNA não codificantes, que exercem apenas funções regulatórias, mas que afetam diretamente esses genes (21).

Pacientes com AF apresentam grande variabilidade nas concentrações de HbF, provavelmente determinado por fatores genéticos. Três locis quantitativos principais (QTLs) estão relacionados às concentrações de HbF na fase adulta, o BCL11A e HBS1L-MYB, elementos reguladores de fatores de transcrição hematopoiéticos, e HBG2-XMN1 pertencente ao gene da  $\beta$ -globina (82,83). Apesar de muitos estudos confirmarem a associação de SNPs destes locis com os níveis de HbF, a exata contribuição dos níveis de HbF na fisiopatologia da AF ainda permanece obscura (84). Poucos estudos buscaram avaliar o efeito dos SNPs destes locis nas características clínicas da doença.

A variabilidade interindividual nos níveis de HbF é considerada um dos principais modificadores responsáveis pela heterogeneidade clínica na AF. Os níveis de HbF são afetados por, entre outros fatores, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene BCL11A e na região intergênica HBS1L-MYB e no gene Xmn1 (85). Estudos genéticos confirmaram a associação de polimorfismos de nucleotídeos único no cluster do gene da hemoglobina, Loci BCL11A e HBS1L-MYB com níveis de HbF em várias populações (86–90).

O loci BCL11A tem sido o marcador genético mais fortemente associado aos níveis de HbF, apresentando-se como um repressor direto de sua produção e um importante regulador do gene da globina (91). Evidências de associação têm sido relatadas na literatura em BCL11A, ocorrendo principalmente em rs1427407. Uma mudança nos alelos altera a sequência de DNA neste loci apresentando-se como um regulador chave, com grande significado funcional e

responsável pela variação de HbF em conjunto com outros marcadores vinculados na mesma região, como rs11886868, rs4671393. O impacto deste locus nos níveis de HbF é verificado em haplótipos que carregam com alta frequência em sua população determinados alelos em comparação a frequências menores em XmnI-HBG2 e variantes em HBS1L-MYB. Indicando assim, que este locus para determinadas populações parece ser o locus modificador de HbF mais influente (84).

Outro locus significativo para persistência e variabilidade de HbF foi localizado no cromossomo 6q23.3 perto do oncogene MYB, se comportando como um QTL (*quantitative trait locus*) que é uma região do DNA que está associada a uma característica fenotípica particular, que varia em grau e que pode ser atribuída a efeitos poligênicos, do produto de dois ou mais genes e seu ambiente (92). Polimorfismos nesta região têm sido associados a variações nos níveis de HbF e parâmetros das células eritróides devido seu papel regulador em MYB. Sua superexpressão ou supressão está diretamente relacionada à inibição ou aumento de hemoglobina em células eritróides e a ocorrência de polimorfismos nesta região afetam diretamente a expressão de MYB, através do fator de transcrição GATA e conseqüentemente os níveis de HbF (93–95). Dois SNPs em HBS1L-MYB estão fortemente vinculados a AF: rs9399137 e rs9402686 (74,84). Enquanto que, Xmn1-HBG2, especificamente rs7482144, ocorre no promotor do gene da globina.

Diante do exposto e dada a importância dos fatores genéticos no curso clínico da doença, verifica-se a necessidade de estudos que analisem a influência destes SNPs juntamente com outros parâmetros na incidência de determinados perfis fenotípicos e gravidade da doença.

#### 2.5.5 MicroRNAs

A eritropoese é um mecanismo que envolve a proliferação e diferenciação de células tronco hematopoiéticas que são influenciadas por diversos fatores como fatores de transcrição, vias de sinalização e pequenos RNAs não codificantes (microRNAs), que desempenham um papel regulador importante, controlando uma gama de mecanismos epigenéticos, como a regulação pós transcricional de vários genes (96,97).

MicroRNAs são pequenos reguladores não codificantes de 18 a 25 pares de bases que atuam na inibição da expressão dos genes, apresentando-se como um regulador potente de diversos genes codificadores de proteínas com envolvimento significativo no desenvolvimento

de doenças. O mecanismo pela qual estes pequenos reguladores agem se dá através da degradação do RNA mensageiro (mRNA), ou pela inibição da tradução. E, dentro deste contexto, alguns microRNAs têm se mostrado fundamentais para diferenciação e maturação de células eritróides durante a eritropoiese (98,99).

Durante muito tempo acreditou-se que os eritrócitos por não conterem núcleo e elementos citoplasmáticos, não apresentavam ácidos nucleicos. Entretanto, estudos com ferramentas genômicas demonstraram que os mesmos possuíam uma grande variedade de microRNAs e que ainda possuíam um papel fundamental na diferenciação e maturação destas células (100,101). Mais tarde, abordagens de microarray identificaram assinaturas restritas de microRNAs que distinguiam AF grave de leve, bem como de crianças saudáveis, indicando que uma assinatura de micrnas circulantes poderiam desempenhar papéis importantes na previsão do curso clínico da AF e no delineamento de abordagens de tratamento clínico (102).

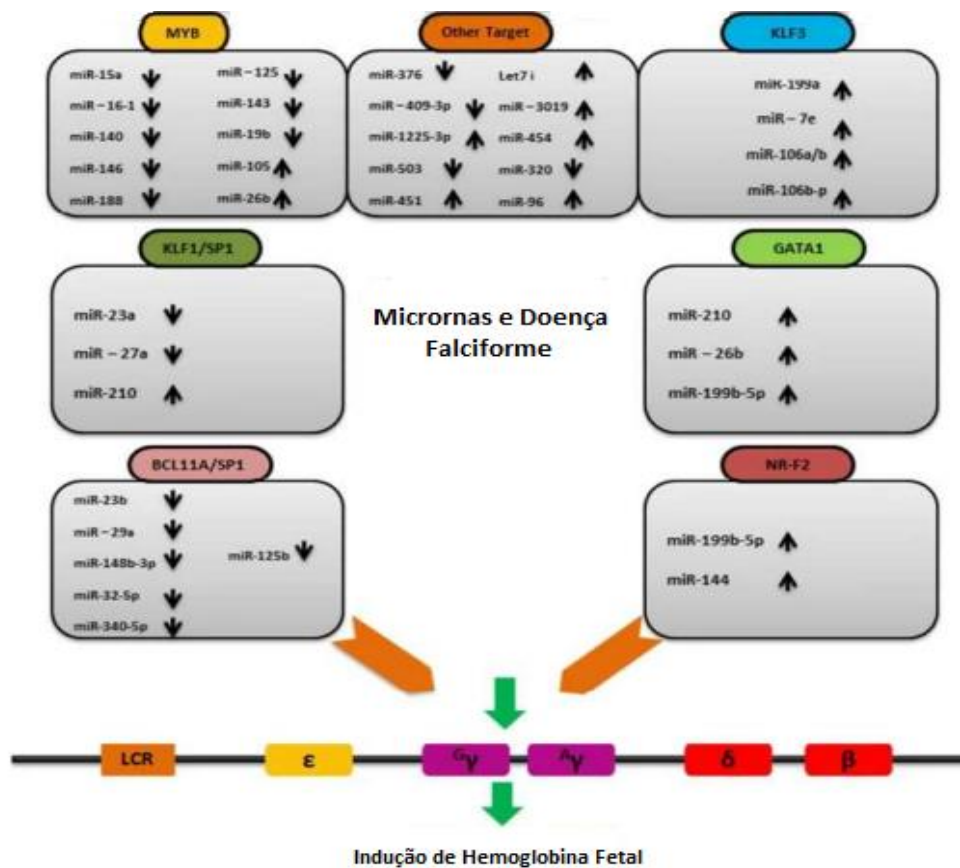


Figura 6: Papel dos micrnas na doença falciforme. Adaptado de Verma (2021).

Assim, mesmo com diferentes abordagens que incluem hidroxiuréia, modificações epigenéticas (por exemplo, inibição da metilação do promotor do gene  $\gamma$  globina ou desacetilação com talidomida e butirato de sódio), a regulação baseada em microRNAs tem ganhado atenção para indução de  $\gamma$  globina com intenção de novas terapêuticas em pacientes com AF (103). Com isto, abordagens mais recentes têm demonstrado que os microRNAs modulam e controlam a expressão do gene da globina, funcionando como um modulador nos níveis de expressão de HbF. Uma regulação positiva do hsa-mir-144 em um grupo de pacientes com doença falciforme com HbF baixa em comparação àqueles com HbF alta foi relatada. Além disso, estudos subsequentes demonstraram que o hsa-mir-144 é capaz de silenciar fator nuclear relacionado 2 (NRF2), desempenhando um papel importante na supressão de  $\gamma$  -globina. O NRF2 é um dos principais fatores de resposta ao estresse oxidativo, a redução deste fator leva a uma diminuição dos níveis de glutathione, deixando as células suscetíveis ao estresse oxidativo. Assim, níveis elevados de hsa-mir-144 na AF reduzem os níveis de NRF2, diminuindo a tolerância destas células ao estresse oxidativo. Uma superexpressão de hsa-mir-144 está relacionada à falta de proteínas antioxidantes e a uma maior gravidade da anemia, predispondo o indivíduo a um maior estresse oxidativo, hemólise e anemia mais grave (103).

Já o hsa-mir-15a é mais um desta gama de pequenos reguladores importantes na fisiopatologia da AF. Estudos de combinação de abordagens genéticas e funcionais em células humanas, têm demonstrado que a superexpressão de miR-15a resulta em elevações na expressão do gene HbF. Este efeito é mediado, pelo menos em parte, através da modulação negativa do fator de transcrição MYB, que é um potente regulador negativo da expressão de HbF e um alvo direto de miR-15a (104).

Outro possível microRNA envolvido na produção de HbF é o miR-210. Já foi relatado sua participação na diferenciação eritróide e, possivelmente, na regulação positiva do gene da  $\gamma$ -globina (105,106). Posteriormente este achado foi confirmado por outros estudos (107–110). O possível envolvimento de miR-210 na produção de HbF também é salientado por Sawant *et al* (2016), que relata a possível indução de HbF por hidroxiuréia mediada pelo mir-210 em pacientes com anemia falciforme. Além disso, existe uma expressiva quantidade de evidências de que os RNAs não codificantes e, em particular, os microRNAs, são membros significativos da resposta adaptativa ao baixo nível de oxigênio. Sendo o microRNA 210 um alvo robusto de fatores induzíveis por hipóxia, onde a indução de hsa-mir-210 parece ser uma característica consistente da resposta à hipóxia. Assim a superexpressão deste microRNA tem sido detectada em pacientes com AF, onde a hipóxia é um componente central da fisiopatologia da doença e

tal resposta adaptativa ao baixo oxigênio abrange processos bioquímicos e celulares complexos, como metabolismo energético, sobrevivência e proliferação celular, angiogênese e adesão (111). Assim, sendo a HbF um fator chave na sobrevivência de pacientes com AF e na redução de hospitalizações, faz-se de extrema importância a análise e o entendimento dos mecanismos regulatórios destes microRNAs como possíveis candidatos à terapêutica, além de sua utilização como biomarcadores de gravidade da doença e monitoramento da ocorrência de possíveis eventos clínicos.

Investigações recentes sugerem que microRNAs distintos desempenham um papel crucial na manutenção da homeostase imunológica. O principal deles, o mir-223 está emergindo como um importante regulador do sistema imunológico (112). O mir-223 demonstrou estar envolvido na regulação da hematopoiese, resposta imune e diferentes tipos de distúrbios inflamatórios. Quando analisado o contexto de inflamação crônica da AF, é evidenciado que a resposta inflamatória induzida por LPS (lesões pulmonares agudas) na AF está associada a aumentos na expressão de mir-223 no pulmão de camundongo; sugerindo um papel deste microRNA na regulação da produção de mediadores inflamatórios, uma vez que esses aumentos estão associados aos aumentos de citocinas e quimiocinas (113). O mir-223 está envolvido na regulação da diferenciação eritróide e megacariocítica (diferenciação hematopoiética). Sendo supresso ou superexpresso na diferenciação eritróide e megacariocítica, respectivamente, tendo como alvo o domínio LMO2. A diminuição do nível de mir-223 pode aumentar a expressão de LMO2 e promover a diferenciação eritróide, enquanto o aumento do nível de mir-223 bloqueia a expressão de LMO2, promovendo a diferenciação megacariocítica em células de origem eritróide (114).

Assim, dentro do contexto de inflamação crônica, ambiente de estresse oxidativo, hipóxia e da importância dos níveis de HbF, 4 microRNAs candidatos estão emergindo como reguladores críticos de uma série de processos celulares, tornando-se putativos na fisiologia da AF: mir-210, mir-144, mir-223 e mir 15a.

#### 2.5.6 Marcadores inflamatórios

Cada vez mais surgem evidências dos processos inflamatórios na fisiopatologia e no curso clínico da AF. A constatação de diversos marcadores de inflamação regulados positivamente, ressaltam a importância destas moléculas como biomarcadores de potenciais valores clínicos (65). É sabido que a inflamação exerce um papel fundamental na fisiopatologia

da anemia falciforme. Um possível impacto clínico das citocinas no curso clínico da AF tem instigado a busca pelo entendimento do possível papel modulador destas proteínas na variabilidade fenotípica da AF. Apesar de classificada como uma doença monogênica, onde os pacientes apresentam uma mesma mutação genética, existe grande heterogeneidade fenotípica com conseqüente variação de gravidade. A heterogeneidade clínica da AF parece estar associada a moduladores ainda não conhecidos em um ambiente multifatorial, incluindo a expressão de moléculas inflamatórias que parecem estar associadas ao curso clínico da doença e conseqüente incidência.

Diante deste contexto, citocinas são mediadores solúveis que controlam numerosas interações críticas entre as células do sistema imunológico. Conceituadas como um grupo de glicoproteínas e peptídeos com pesos moleculares de 6.000 a 60.000 que constituem a sinalização intercelular (115). O termo citocinas refere-se a um conceito generalista, sendo classificadas de acordo com a célula de origem ou sua atividade (116):

- Linfocinas: origem nos linfócitos
- Monocinas: origem nos monócitos
- Interleucinas: origem nos leucócitos que atuam sobre outros leucócitos
- Quimiocinas: possuem atividades quimiotáticas

As citocinas ainda podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo de ação (117):

- Hematopoiético: SCF, IL-3, TPO, EPO, GM-CSF, G-CSF, M-CSF
- Crescimento e diferenciação: PDGF, EGF, FGF, IGF, TGFb, VEGF
- Imunoregulatória: TGFb, IFNg, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-18
- Pró-inflamatória: IL-1a, IL-1b, TNFa, LT, IL-6, LIF, IL-17
- Antiinflamatória: IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-13
- Quimiotático: IL-8, MIP-1a, MIP-1b, MCP-1, RANTES

Quanto ao seu mecanismo de atuação, elas podem atuar sobre as células que a segregam (forma autócrina), em células distantes (endócrinas) ou em células vizinhas (ação parácrina). Já



em relação à comunicação célula – célula as citocinas podem exercer um efeito antagônico, onde duas ou mais podem atuar e quando os efeitos de uma citocina inibem ou compensam o efeito de outra, classifica-se como um efeito antagonista. Quando uma citocina exerce diferentes ações em diferentes tipos de células denomina-se pleiotropia. Por conseguinte, o efeito redundante se observa quando duas ou mais citocinas desempenham funções semelhantes numa mesma célula. E, por fim, a indução em cascata ocorre quando a citocina secretada por um tipo de célula ativa outras células que vão secretar outra citocina que irá atuar sobre outras células e assim progressivamente (117).

Existem vários fatores que controlam a síntese de citocinas na linhagem hematopoiética. A natureza dos estímulos que desencadeiam a síntese varia com o tipo de célula e o seu estado de maturação, diferenciação e a natureza do estímulo, conforme figura 1 (118).

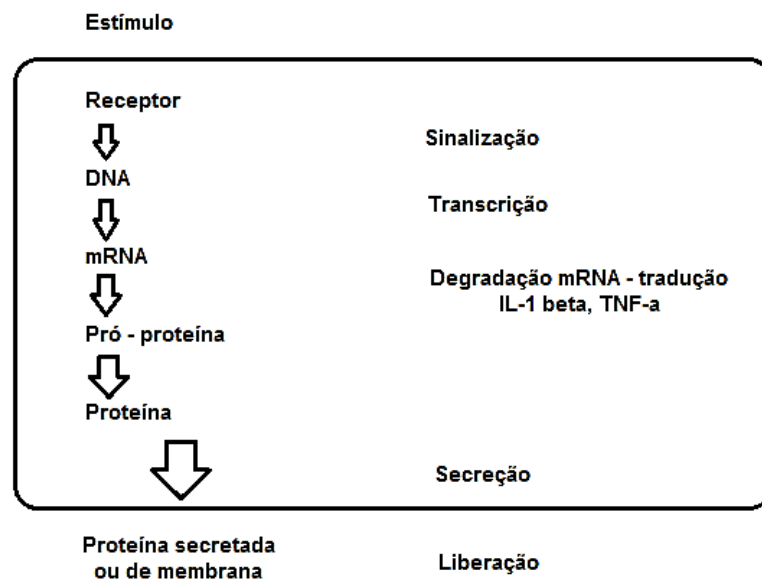


Figura 7: Múltiplos níveis de regulação das citocinas. Kelso (1998)

Embora cada tipo específico de célula possa produzir citocinas, a maioria das linhagens expressa apenas um conjunto de genes para citocinas. Porém dentro destas linhas ainda pode ocorrer outras especializações de acordo com o estado de ativação de cada célula ou de diferenciação (118).

A seguir são apresentadas as principais propriedades para um melhor entendimento das funções das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento.

**Tabela 1: Principais propriedades das Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento humano.**

<b>Citocina</b>	<b>Principal Celular</b>	<b>Fonte</b>	<b>Principais Efeitos</b>
<b>IL-1<math>\alpha</math> e <math>\beta</math></b>	Macrófagos APCs Outras somáticas	células	Co- estimulação de APCs e células T Crescimento de células B Produção de Ig Resposta fase aguda Ativação fagócitos Promove hematopoese Inflamação e Febre
<b>IL-2</b>	Células TH2 ativadas CTL Células NK		Proliferação das células T ativadas Apoptose das células T após ativação prolongada Funções das células NK e CTL Proliferação das células B Expressão de IgG2
<b>IL-3</b>	Linfócitos T		Crescimento dos progenitores hematopoéticos iniciais
<b>IL-4</b>	Células TH2 Mastócitos		Proliferação células B Expressão IgE Expressão MHC II Proliferação e função células TH2 e CTL Crescimento e função dos eosinófilos e mastócitos Inibe a produção de monocinas
<b>IL-5</b>	Células TH2 Mastócitos		Crescimento e função dos eosinófilos
<b>IL-6</b>	Células TH2 ativadas APCs Células somáticas		Efeito sinérgico com IL-1 ou TNF $\alpha$ Febre Resposta de fase aguda Crescimento células B Produção de IgG Hematopoese
<b>IL-7</b>	Células do timo		Linfopoese T e B Funções do CTL

	Células medular	estroma	
<b>IL-8</b>	Macrófagos Outras células somáticas		Quimioatração de neutrófilos e células T Angiogênica
<b>IL-9</b>	Células T		Efeitos hematopoiéticos e timopoéticos
<b>IL-10</b>	Linfócitos TCD8 Linfócitos B ativados Macrófagos	TH2 e	Inibe a produção de citocinas pelas células TH1, células NK e APCs Promove proliferação das células B Suprime a imunidade celular
<b>IL-11</b>	Células do estroma		Efeitos sinérgicos sobre a hematopoese e trombopoese
<b>IL-12</b>	Células B Macrófagos		Proliferação e função dos CTL ativados e células NK Produção de IFN $\gamma$ Indução de células TH1 Suprime as funções de células TH2 Promove imunidade celular
<b>IL-13</b>	Células TH2		Semelhante aos efeitos da IL-4, porém aditiva
<b>IL-15</b>	Células epiteliais e monócitos Células linfocíticas	e não	Imita os efeitos da IL-2 sobre as células T Ativação dos mastócitos e das células NK
<b>IL-16</b>	Linfócitos TCD8 Alguns linfócitos TCD4		Quimioatrai as células TCD4, eosinófilos e monócitos Comitogênico para células TCD4

**IL-17** Células T de memória ativadas Promove proliferação das células T e o desenvolvimento dos neutrófilos

**IL-18** Macrófagos  
Queratinócitos Co-induz a produção de IFN $\gamma$   
Co-ativa o desenvolvimento de células TH1 e NK

**TNF $\alpha$**  Macrófagos ativados  
Outras células somáticas Efeitos semelhantes da IL-1  
Trombose Vascular  
Necrose tumoral

**LT $\alpha$**  Células TH1 ativadas Efeitos semelhantes aos da IL-1 e TNF $\alpha$

**IFN $\alpha$  e  $\beta$**  Macrófagos  
Neutrófilos  
Outras células somáticas Efeitos antivirais  
Indução MHC I em células somáticas  
Ativação dos macrófagos e das células NK

**IFN $\gamma$**  Células TH1 e NK  
ativadas Indução MHC I  
Em células somáticas  
Indução MHC II em APCs e células somáticas  
Ativação macrófagos, neutrófilos e células NK  
Inibição da TH2  
Efeitos antivirais

**TGF $\beta$**  Linfócitos T ativados  
Plaquetas  
Macrófagos  
Outras células somáticas Antiinflamatório (supressão na produção de citocinas e expressão de MHC II)  
Antiproliferativo para células tronco, células mononucleares e linfócitos  
Promoção da proliferação dos fibroblastos  
Cicatrização de feridas

**G-CSF** Fibroblastos  
Monócitos Estimula o desenvolvimento e a diferenciação de neutrófilos

**GM-CSF** Macrófagos  
Células T Estimulam crescimento e a diferenciação de células da linhagem dos mielócitos, principalmente as dendríticas

<b>M-CSF</b>	Células T	Estimula o crescimento de células da linhagem de monócitos
	Células do estroma da MO	
	Osteoblastos	

Fonte: Parslow, 2004.

Embora muitos estudos tenham analisado padrões de mediadores inflamatórios na AF, a relação e a contribuição destas moléculas no estado inflamatório e no curso clínico da doença ainda precisam ser elucidadas. Estudos têm evidenciado que a AF é caracterizada por um perfil inflamatório distinto de indivíduos sem a patologia independentemente da condição clínica destes pacientes, onde o estado inflamatório é observado em pacientes em estado estável caracterizado por um aumento de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (119). Tais moléculas parecem estarem envolvidas na contribuição de eventos de vaso-oclusão (1,120).

O estado de inflamação crônica apresentado por pacientes em estado estacionário parece ser caracterizado por níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, porém com um menor envolvimento endotelial (121,122).

Níveis de interleucinas circulantes têm sido associadas a diversas manifestações clínicas, como potenciais biomarcadores para condições clínicas distintas. Níveis circulantes de IL-10 apresentam-se superexpressos em indivíduos HbSS quando comparados com doadores saudáveis, já IL-1Ra apresentou-se diminuída em indivíduos com a patologia e IL-6 apesar de superexpressa em indivíduos HbSS, ainda contribui para identificar crises vaso-oclusivas com um aumento ainda maior (119). Já fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na AF é um marcador que indica danos aos vasos sanguíneos e hipoxemia se correlacionando bem com muitos outros biomarcadores, indicando outros problemas, como hemólise e inflamação (65).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória produzido principalmente por monócitos e macrófagos que contribui para a vaso-oclusão na AF, aumentando a adesividade endotelial, ativando leucócitos e a cascata de coagulação. Tem sido encontrado níveis significativamente mais altos desta citocina quando comparados a controles saudáveis, entretanto pode não ser

diferente em pacientes com AF durante estágio estável e condições de crises vaso-oclusivas, por exemplo (123).

## 2.6 MEDINDO A GRAVIDADE DA ANEMIA FALCIFORME

Prever ou ter a possibilidade de determinar a gravidade da AF ou até mesmo fenótipos com desenvolvimento de determinadas manifestações permitiria uma possibilidade de prognóstico confiável que levasse a uma tomada de decisão terapêutica efetiva. Apesar de alguns fatores de risco na doença serem bem estabelecidos, isoladamente tornam-se insuficientes para prever a gravidade global da doença.

Sistemas de classificação da doença falciforme têm sido foco de algumas pesquisas. Entretanto, sem uma abordagem multifatorial, podem ocultar diversos fatores que têm demonstrado um papel fundamental nas variações de gravidade da doença. Desenvolver e avaliar um índice de gravidade para doença falciforme é um desafio antigo. Cameron *et al* (1983), com um estudo focado para o espectro de apresentação clínica do paciente com posterior comparação com índices quantitativos como idade no diagnóstico, número de hospitalizações, número e tipos de crises, presença ou ausência de infecção pneumocócica, envolvimento de órgãos principais e deficiência de crescimento desenvolveu um modelo que possibilitasse uma avaliação da gravidade (124). Uma gama de estudos até o momento investigou a relação de parâmetros hematológicos e bioquímicos com a gravidade clínica da AF (4–9). Outros usaram apenas as taxas de crises de dor para avaliar a gravidade da doença (10–12).

Mais recentemente um sistema composto por poucas características do paciente, obtidas em visita clínica, foi desenvolvido por Shah *et al* (2020), usando um sistema Delphi modificado (RAND/UCLA) no desenvolvimento de um sistema de gravidade (13). Outro modelo de análise proposto foi a modelagem da rede bayesiana, onde 25 eventos clínicos e testes laboratoriais foram usados para estimar a gravidade da doença falciforme (14). Sendo o CSSCD (Cooperative Study of Sickle Cell Disease) o primeiro grupo a buscar uma modelagem mais ampla do desfecho de gravidade clínica para a doença. Entretanto, a classificação não abordou fatores genéticos que provavelmente modulam as variáveis e eventos clínicos analisados. A maioria dos estudos de associação de genótipo-fenótipo não aborda aspectos laboratoriais da doença para um entendimento multifatorial e medida da doença. E diante deste contexto,

diversos determinantes, modificadores e marcadores de gravidade da doença tem sido alvo de estudos isoladamente (3). Integrar uma gama de variáveis preditoras de gravidade, desenvolver e validar uma medida composta tem sido um desafio. E, diante desta lacuna, a necessidade de uma análise multifatorial direcionada ao fenótipo e gravidade poderá elucidar e levar a importantes descobertas de associação.

Atualmente moduladores de gravidade para a doença são conhecidos, variáveis como  $\alpha$ -talassemia, HbF, índices laboratoriais e idade têm sido discutidos extensivamente e são estimados como biomarcadores de gravidade, entretanto de forma isolada acabam se tornando insuficientes na precisão para fins de diagnóstico (21,125). Dentre os preditores já estabelecidos das complicações da AF, a HbF é o modulador genético melhor estudado até o momento, porém permanecendo ainda obscuro a tamanha variação entre os indivíduos com a mesma patologia, tornando-a insuficiente para uma predição da gravidade. Além disto, a expressão de hemoglobina fetal é dependente de regulação genética que envolve inúmeras interações, tais como regulação transcricional e polimorfismos nos genes que a regulam (74,126,127). A  $\alpha$ -talassemia é outro preditor já estabelecido, e que apesar de reduzir a concentração de HbS e consequente polimerização, clinicamente parece ter efeito apenas em complicações relacionadas à hemólise, apresentando ainda um risco aumentado de complicações de subfenótipo vaso-oclusivo (125,128).

Pequenos reguladores pós transcricionais (microRNAs) também tem sido explorado e apresentado como essenciais para diversos processos celulares, podendo regular uma gama de genes alvos (129,130). Ademais, a AF é uma doença caracterizada por inflamação aguda e crônica, e tanto as manifestações vaso-oclusivas quanto de hemólise estão associadas a eventos inflamatórios com a produção de citocinas e mediadores inflamatórios que têm sido estudados como potenciais modificadores e influenciadores da patogênese da AF (121,131).

Diversos outros potenciais preditores parecem agir independentemente, além da polimerização ocasionada por HbS e a presença de  $\alpha$ -talassemia. Neste âmbito surgem não apenas novas variantes a serem estudadas, mas também a necessidade de uma análise composta da interação destes fatores na fisiopatologia da doença. Uma associação de fatores de risco já estabelecidos juntamente com estudos de associação genética que possibilitem uma ligação de polimorfismos genéticos com subfenótipos da doença podem fornecer métodos de predição, com um prognóstico mais preciso e com a possibilidade de uma terapia mais individualizada, evitando intervenções desnecessárias (125).

Assim, uma análise composta de potenciais preditores de gravidade da doença que agem independentemente da polimerização de HbSS, como mediadores de inflamação, marcadores de lesão oxidativa, marcadores relacionados a biologia do óxido nítrico, de vaso regulação, interação célula-célula, coagulação, hemostasia, fatores de crescimento, citocinas e receptores e reguladores transcricionais, além de polimorfismos em muitos genes que plausivelmente afetam o fenótipo da doença falciforme poderá levar a uma estratificação fenotípica com potencial utilidade clínica.



### 3 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Este estudo foi elaborado através de revisão bibliográfica de artigos científicos publicados em revistas, periódicos e jornais nacionais e internacionais, que teve como objetivo identificar artigos publicados nos últimos anos que abordassem temas relacionados à questão de pesquisa: “A análise multifatorial e a correlação de moduladores de gravidade em pacientes com anemia falciforme proporciona uma estratificação dos fenótipos para predição da gravidade, potencial utilidade clínica e direcionamento de terapias individualizadas?”. Assim, o objetivo da revisão foi levantar dados referentes à relação entre os moduladores da gravidade da Anemia Falciforme e sua relação com a heterogeneidade do perfil fenotípico. Foram selecionadas as publicações nas bases de dados do PubMed e Embase, utilizando-se associados e/ou isoladamente os unitermos *Sickle cell anemia*, *clinical severity*, *MiRNAs*, *Cytokine*, *SNPs*, *biomarkers and severity score* juntamente com os *Mesh Terms e Emtree* para investigações publicadas entre 1949 e 2021.

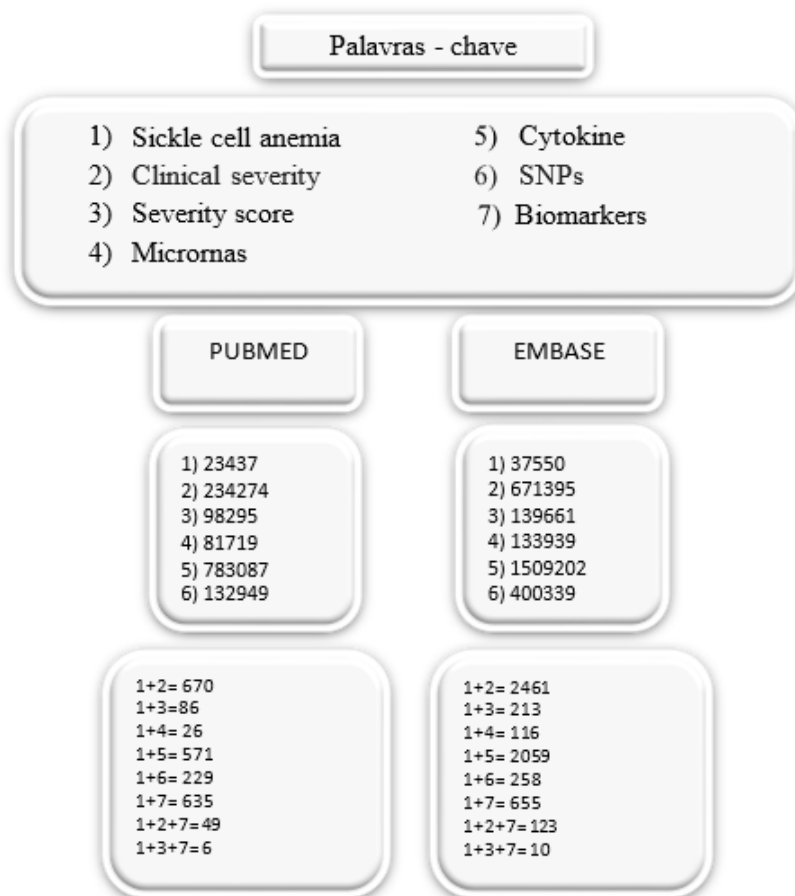


Figura 8: Estratégia de Busca Bibliográfica.

Após consulta nas duas bases de dados (PUBMED e EMBASE) foram selecionados os artigos. A primeira seleção se baseou por triagem dos títulos, levando em consideração os critérios de exclusão. Posteriormente, uma segunda seleção foi aplicada mediante leitura dos resumos dos artigos pré-selecionados na primeira seleção. Após aplicou-se uma leitura criteriosa acerca do tema, e fez-se uma revisão das referências que incluiu novos artigos, totalizando 131 artigos incluídos na revisão bibliográfica do trabalho, conforme abaixo:

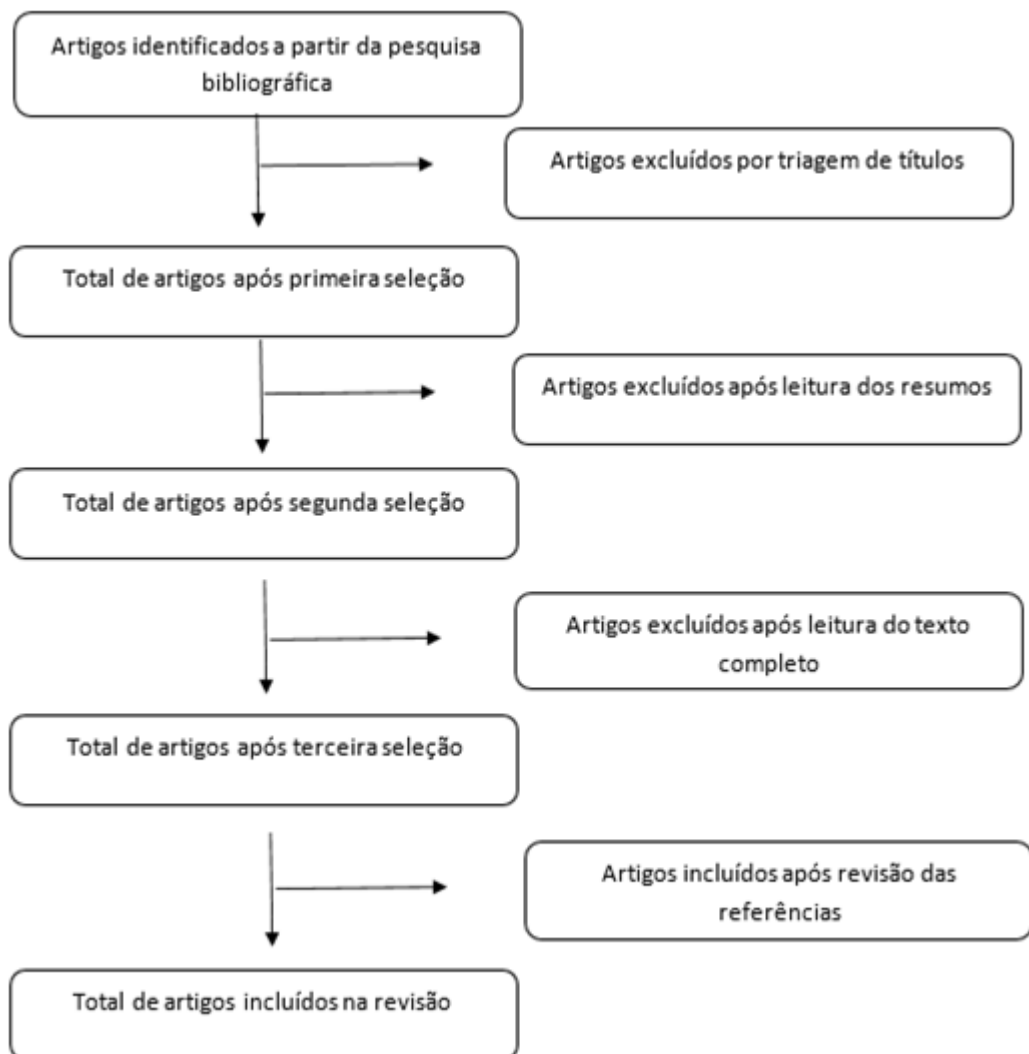


Figura 9: estratégia de seleção

#### 4 MARCO CONCEITUAL

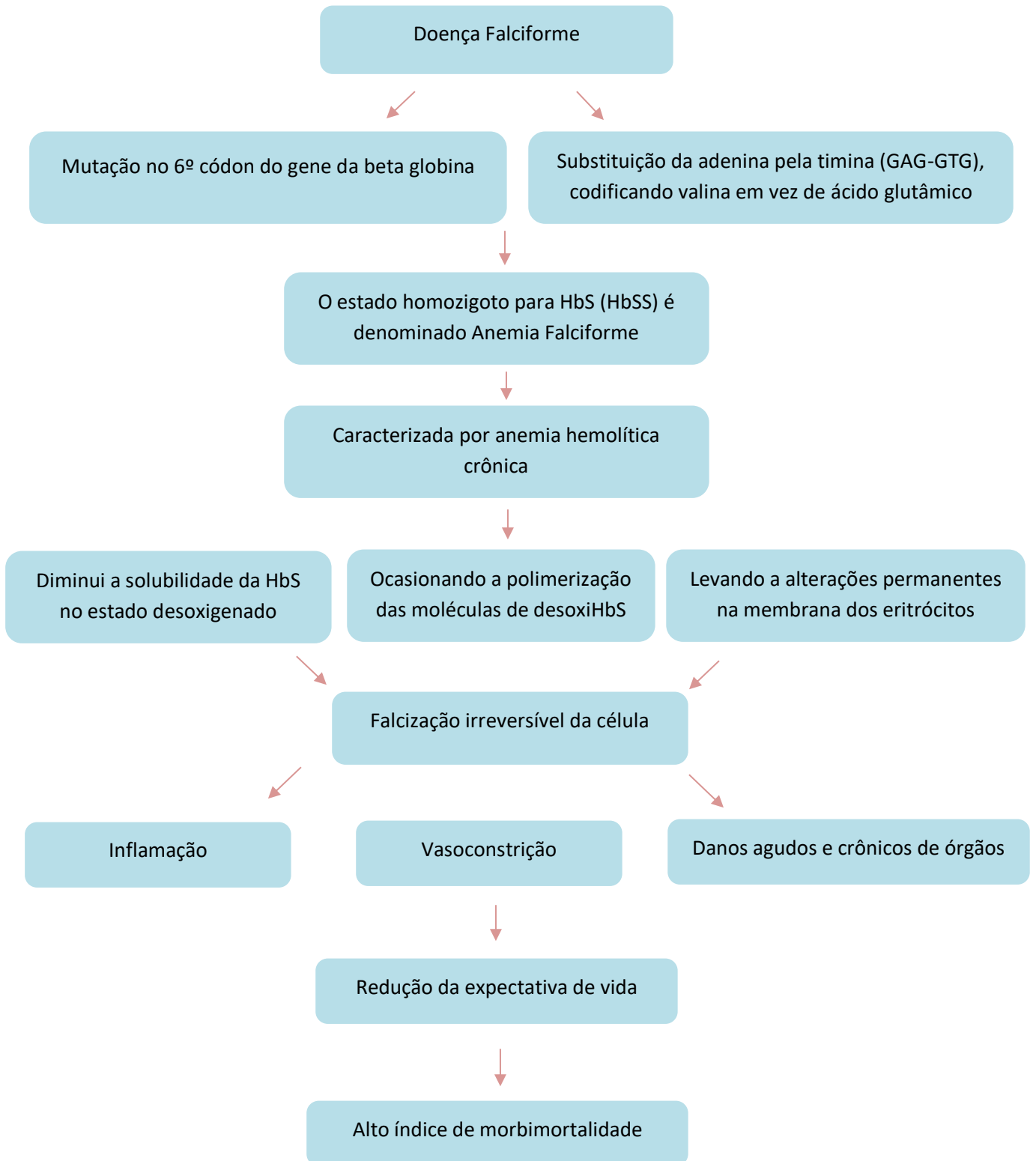


Figura 10: Marco conceitual da Anemia Falciforme. Elaborado pelo autor.

## **5 JUSTIFICATIVA**

Apesar de classificada como uma doença monogênica, a AF é a doença mais grave dentre as doenças falciformes devido ao seu elevado índice de morbimortalidade. O maior desafio atualmente no âmbito da AF é distinguir os principais moduladores da gravidade da doença e a integração das mesmas como fatores de prognóstico. No cenário atual, a taxa de crises anual tem sido o único preditor da gravidade da doença, o que se torna extremamente restrito para uma doença multifatorial e com complicações multisistêmicas. Diante deste contexto, este estudo teve por objetivo a estratificação do perfil fenotípico através da identificação e integração de moduladores que possam proporcionar prognósticos que levem a perspectivas da gravidade da doença e futuras complicações clínicas. A integração dos principais fatores e a influência de cada parâmetro nas complicações e na fisiopatologia da doença podem levar a uma medida global com extremo potencial de utilidade clínica através do direcionamento de terapias. E, é diante deste contexto que o trabalho se justifica.

## **6 OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO PRIMÁRIO**

Analisar a nível multifatorial os moduladores da gravidade da AF e explorar racionalmente os parâmetros dos mecanismos reguladores e de danos para estratificação do perfil fenotípico como ferramenta de predição da gravidade e acessibilidade a terapias individualizadas.

### **6.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

Caracterizar através da genotipagem por PCR em tempo real as variações de sequências de DNA no gene da hemoglobina fetal que levem ou contribuam para fenótipos específicos da AF;

Explorar associações putativas entre perfis fenotípicos e polimorfismos do gene candidato que codifica os níveis de hemoglobina fetal;

Identificar através de exames laboratoriais fatores de prognósticos que possam fornecer informações precoces sobre complicações clínicas subsequentes;

Verificar através de citometria (Luminex) a quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento a associação do perfil inflamatório sobre a gravidade da AF;

Analisar por PCR quantitativo os níveis de expressão de micrornas em amostras de pacientes com Anemia Falciforme;

Correlacionar os níveis de expressão de micrornas com moduladores da gravidade e dados clínicos da doença;

Traçar através da estratificação do perfil fenotípico preditores e biomarcadores putativos dos desfechos clínicos;

Definir potenciais determinantes e modificadores da gravidade da doença e correlacionar os resultados com potencial de utilidade clínica e possíveis novas terapêuticas individualizadas para a doença.

## 7. FLOWCHART

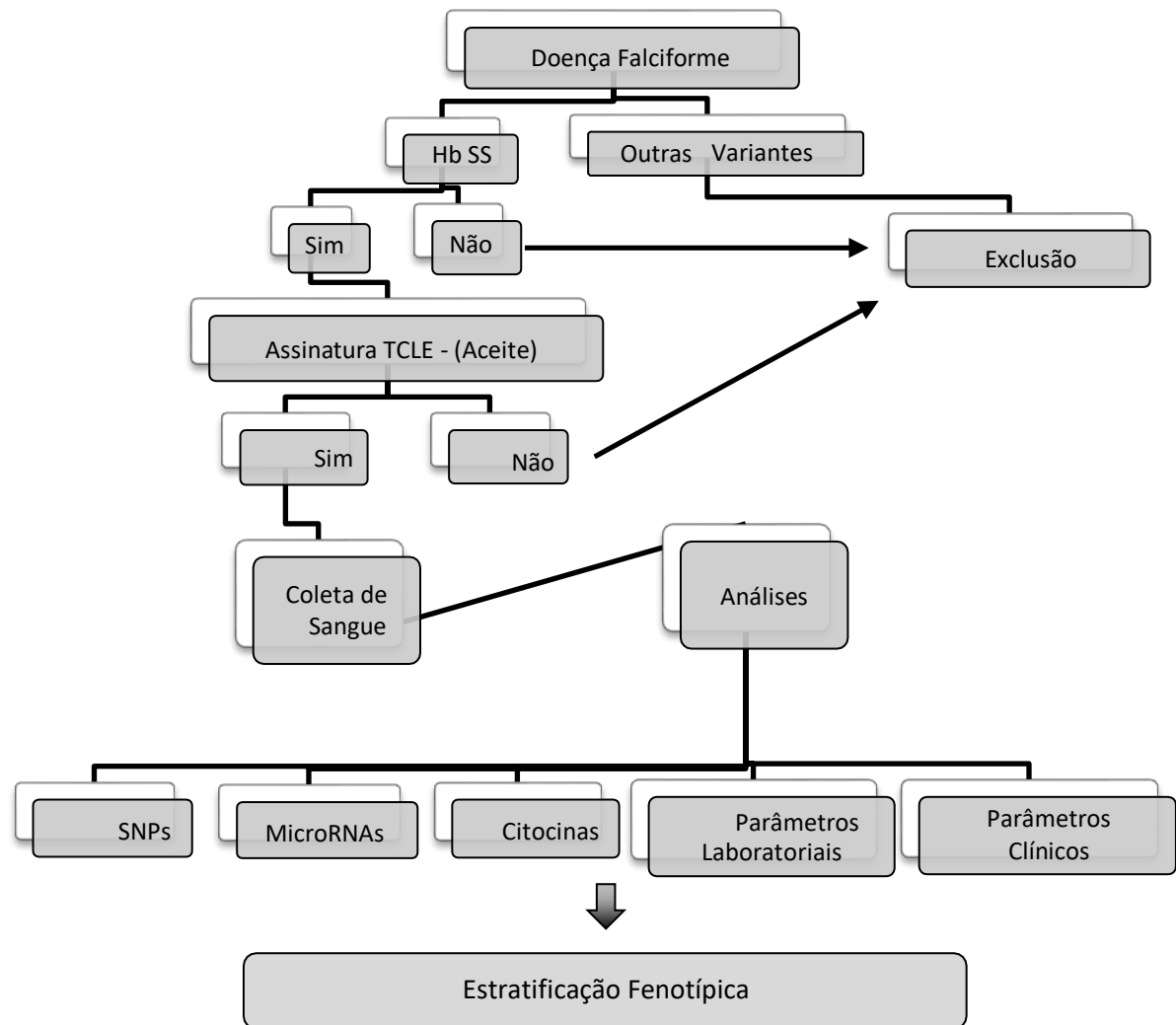


Figura 11: Esquematização representativa dos processos, fluxos e ações executadas.

## 8 REFERÊNCIAS

1. Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2019;14:263–92.
2. Williams TN, Thein SL. Sickle cell anemia and its phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2018;19(March):113–47.
3. Quinn CT. Minireview: Clinical severity in sickle cell disease: the challenges of definition and prognostication. *Exp Biol Med*. 2016;241(7):679–88.
4. Da Guarda CC, Yahouédéhou SCMA, Santiago RP, Fernandes CFDL, Neres JS, Oliveira AMDJ, et al. Investigation of Lipid Profile and Clinical Manifestations in SCA Children. *Dis Markers*. 2020;2020.
5. Kalpatthi R, Novelli EM. Measuring success: Utility of biomarkers in sickle cell disease clinical trials and care. *Hematol (United States)*. 2018;2018(1):482–92.
6. Teixeira RS, Terse-Ramos R, Ferreira TA, Machado VR, Perdiz MI, Lyra IM, et al. Associations between endothelial dysfunction and clinical and laboratory parameters in children and adolescents with sickle cell anemia. *PLoS One*. 2017;12(9):1–14.
7. Nourai M, Ashley-Koch AE, Garrett ME, Sritharan N, Zhang Y, Little J, et al. Serum albumin is independently associated with higher mortality in adult sickle cell patients: Results of three independent cohorts. *PLoS One [Internet]*. 2020;15(8 July):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0237543>
8. Brousse V, El Hoss S, Bouazza N, Arnaud C, Bernaudin F, Pellegrino B, et al. Prognostic factors of disease severity in infants with sickle cell anemia: A comprehensive longitudinal cohort study. *Am J Hematol*. 2018;93(11):1411–9.
9. Garadah TS, Jaradat AA, AlAlawi ME, Hassan AB, Sequeira RP. Pain frequency, severity and QT dispersion in adult patients with sickle cell anemia: Correlation with inflammatory markers. *J Blood Med*. 2016;7:255–61.
10. Darbari DS, Brandow AM. Pain-measurement tools in sickle cell disease: Where are we now? *Hematology*. 2017;2017(1):534–41.
11. Darbari DS, Onyekwere O, Nourai M, Minniti CP, Luchtman-Jones L, Rana S, et al. Markers of severe vaso-occlusive painful episode frequency in children and adolescents with sickle cell anemia. *J Pediatr*. 2011;23(1):1–7.
12. Nebor D, Bowers A, Hardy-Dessources MD, Knight-Madden J, Romana M, Reid H, et al. Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympatho-vagal balance, blood viscosity and inflammation. *Haematologica*. 2011;96(11):1589–94.
13. Shah N, Beenhouwer D, Broder MS, Bronte-Hall L, De Castro LM, Gibbs SN, et al. Development of a severity classification system for sickle cell disease. *Clin Outcomes Res*. 2020;12:625–33.
14. Sebastiani P, Nolan VG, Baldwin CT, Abad-grau MM, Wang L, Adewoye AH, et al. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. *Blood J*.

- 2016;110(7):2727–36.
15. Herrick J. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Intern Med.* 1910;6:517–21.
  16. Pauling L, Itano H, Singer S, Wells I. Sickle cell anemia: a molecular disease. *Science* (80- ). 1949;(110):543–8.
  17. Ingram VM. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature.* 1957;180:326–8.
  18. Steinberg MH. Sickle Cell Disease as a Multifactorial Condition. *Encycl Life Sci.* 2006;1–5.
  19. Ofori-Acquah SF. Sickle cell disease as a vascular disorder. *Expert Rev Hematol* [Internet]. 2020;13(6):645–53. Available from: <https://doi.org/10.1080/17474086.2020.1758555>
  20. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev.* 2007;21(1):37–47.
  21. Habara A, Steinberg MH. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. *Exp Biol Med.* 2016;241(7):689–96.
  22. Serjeant GR. The natural history of sickle cell disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(10):1–12.
  23. Rasche T, Emmert D, Seidel H, Sellin J, Conrad R, Mücke M. Pain management in sickle cell disease. *Schmerz.* 2020;34(3):285–96.
  24. Kane I, Nagalli S. Splenic Sequestration Crisis. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL); 2021.
  25. Esterson YB, Sheth S, Kawamoto S. Splenic sequestration in the adult: cross sectional imaging appearance of an uncommon diagnosis. *Clin Imaging* [Internet]. 2021;69(August 2020):369–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clinimag.2020.10.016>
  26. Sigal IR, Ciunci CA. Case Report of Acute Splenic Sequestration Crisis in an Adult Patient with Hb S Disease and Suspected Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin. *Hemoglobin.* 2020;
  27. Ladu AI, Aiyenigba AO, Adekile A, Bates I. The spectrum of splenic complications in patients with sickle cell disease in Africa: a systematic review. *Br J Haematol.* 2020;
  28. Brousse V, Buffet P, Rees D. The spleen and sickle cell disease: The sick(led) spleen. *Br J Haematol.* 2014;166(2):165–76.
  29. El Hoss S, Cochet S, Marin M, Lapoumériou C, Dussiot M, Bouazza N, et al. Insights into determinants of spleen injury in sickle cell anemia. *Blood Adv.* 2019;3(15):2328–36.
  30. Owusu-Ofori S, Remington T. Splenectomy versus conservative management for acute sequestration crises in people with sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev.*



2017;2017(11).

31. Hankins JS, Ware RE, Rogers ZR, Wynn LW, Lane PA, Scott JP, et al. Long-term hydroxyurea therapy for infants with sickle cell anemia: The HUSOFT extension study. *Blood*. 2005;106(7):2269–75.
32. Sagi V, Mittal A, Tran H, Gupta K. Pain in sickle cell disease: current and potential translational therapies. *Transl Res*. 2021;
33. Osunkwo I, O'Connor HF, Saah E. Optimizing the management of chronic pain in sickle cell disease. *Hematol (United States)*. 2020;20(1):562–9.
34. Osunkwo I, Manwani D, Kanter J. Current and novel therapies for the prevention of vaso-occlusive crisis in sickle cell disease. *Ther Adv Hematol*. 2020;11.
35. Sagi V, Argueta DA, Kiven S, Gupta K. Integrative approaches to treating pain in sickle cell disease: Pre-clinical and clinical evidence. *Complement Ther Med [Internet]*. 2020;51(March):102394. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102394>
36. Adesina OO, Neumayr LD. Osteonecrosis in sickle cell disease: An update on risk factors, diagnosis, and management. *Hematol (United States)*. 2019;2019(1):351–8.
37. Severyns M, Gayet LE. Aseptic osteonecrosis of the femoral head in patients with sickle cell anemia. *Morphologie [Internet]*. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2020.08.002>
38. Worrall D, Smith-Whitley K, Wells L. Hemoglobin to Hematocrit Ratio: The Strongest Predictor of Femoral Head Osteonecrosis in Children with Sickle Cell Disease. *J Pediatr Orthop*. 2016;
39. Chaar V, Kéclard L, Diara JP, Leturdu C, Elion J, Krishnamoorthy R, et al. Association of UGT1A1 polymorphism with prevalence and age at onset of cholelithiasis in sickle cell anemia. *Haematologica*. 2002;(March):1405–9.
40. Theocharidou E, Suddle AR. The Liver in Sickle Cell Disease. *Clin Liver Dis [Internet]*. 2019;23(2):177–89. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cld.2018.12.002>
41. Gumiero APS, Brandão MÂB, Pinto EALC, Anjos AC dos. Colelitíase no paciente pediátrico portador de doença falciforme. *Rev Paul Pediatr*. 2007;25(4):377–81.
42. Aggeli C, Polytarchou K, Dimitroglou Y, Patsourakos D, Delicou S, Vassilopoulou S, et al. Stroke and presence of patent foramen ovale in sickle cell disease. *J Thromb Thrombolysis [Internet]*. 2021;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s11239-021-02398-3>
43. Ahmad M, Dar N, Bhat Z, Hussain A, Shah A, Liu H, et al. Inflammation in Ischemic Stroke: Mechanisms, Consequences and Possible Drug Targets. *CNS Neurol Disord - Drug Targets*. 2014;13(8):1378–96.
44. Bonaventura A, Liberale L, Vecchié A, Casula M, Carbone F, Dallegri F, et al. Update on inflammatory biomarkers and treatments in ischemic stroke. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):1–53.
45. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*.

- 2007;184(1–2):53–68.
46. Booth C, Inusa B, Obaro SK. Infection in sickle cell disease: A review. *Int J Infect Dis.* 2010;14(1):2–12.
  47. Ochocinski D, Dalal M, Black LV, Carr S, Lew J, Sullivan K, et al. Life-Threatening Infectious Complications in Sickle Cell Disease: A Concise Narrative Review. *Front Pediatr.* 2020;8(February).
  48. Friend A, Girzadas. D. Acute Chest Syndrome. In: StatPearls Publishing. 2020.
  49. Saleh M, Asemota J. Severe Acute Chest Syndrome in a Sickle Cell Patient That Required Repeated Exchange Transfusion. *Cureus.* 2021;13(2):2–4.
  50. Allali S, Taylor M, Brice J, Montalembert M de. Chronic organ injuries in children with sickle cell disease. *Haematologica.* 2021;
  51. Hammoudi N, Lionnet F, Redheuil A, Montalescot G. Cardiovascular manifestations of sickle cell disease. *Eur Heart J.* 2020;41(13):1365–73.
  52. Cancado RD, Olivato MCA, Filho NNL, Campos O, Chiattoni C. Pulmonary Hypertension as a Risk Factor for Death in Patients with Sickle Cell Anemia. *Blood.* 2008;112(11):4819–4819.
  53. Sedrak A, Kondamudi NP. Sickle Cell Disease. *StatPearls Publ.* 2021;
  54. Ogu UO, Badamosi NU, Camacho PE, Freire AX, Adams-Graves P. Management of sickle cell disease complications beyond acute chest syndrome. *J Blood Med.* 2021;12:101–14.
  55. Hoppe C, Neumayr L. Sickle Cell Disease: Monitoring, Current Treatment, and Therapeutics Under Development. *Hematol Oncol Clin North Am [Internet].* 2019;33(3):355–71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2019.01.014>
  56. Hoban MD, Orkin SH, Bauer DE. Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. *Blood.* 2016;127(7):839–48.
  57. Ferrone FA. Sickle cell disease: Its molecular mechanism and the one drug that treats it. *Int J Biol Macromol [Internet].* 2016;93:1168–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.073>
  58. Ataga KI, Kutlar A, Kanter J, Liles D, Cancado R, Friedrisch J, et al. Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med.* 2017;376(5):429–39.
  59. AlDallal SM. Voxelotor: A Ray of Hope for Sickle Disease. *Cureus.* 2020;12(2):1–5.
  60. Yenamandra A, Marjonku D. Voxelotor: A Hemoglobin S Polymerization Inhibitor for the Treatment of Sickle Cell Disease. *J Adv Pract Oncol.* 2020;
  61. Field JJ. Can selectin and iNKT cell therapies meet the needs of people with sickle cell disease? *Hematol (United States).* 2015;2015(1):426–32.
  62. Park SH, Bao G. CRISPR/Cas9 gene editing for curing sickle cell disease. *Transfus Apher Sci.* 2021;60.

63. Drysdale CM, Nassehi T, Gamer J, Yapundich M, Tisdale JF, Uchida N. Hematopoietic Stem Cell-Targeted Gene-Addition and Gene-Editing Strategies for  $\beta$ -hemoglobinopathies. *Cell Stem Cell*. 2021;28(2):191–208.
64. Park SH, Lee CM, Dever DP, Davis TH, Camarena J, Srifa W, et al. Highly efficient editing of the  $\alpha$ -globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. 2019;47(15):7955–72.
65. Damanhoury GA, Jarullah J, Marouf S, Hindawi SI, Mushtaq G, Kamal MA. Clinical biomarkers in sickle cell disease. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2015;22(1):24–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.09.005>
66. Rees DC, Gibson JS. Biomarkers in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2012;156(4):433–45.
67. Steinberg MH, Kumar S, Murphy GJ, Vanuytsel K. Sickle cell disease in the era of precision medicine: looking to the future. *Expert Rev Precis Med Drug Dev*. 2020;4:357–67.
68. Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of fetal hemoglobin: New insights emerging from genomics and clinical implications. *Hum Mol Genet*. 2009;18(R2):216–23.
69. Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin CT, Sebastiani P, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*. 2011;118(1):19–27.
70. Steinberg MH, Chui DHK, Dover GJ, Sebastiani P, Alsultan A. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: A glass half full? *Blood*. 2014;123(4):481–5.
71. Pandey S, Sharma A, Dahia S, Shah V, Sharma V, Mishra RM, et al. Biochemical indicator of sickle cell disease: Preliminary report from India. *Indian J Clin Biochem*. 2012;27(2):191–5.
72. Ngo-Bitoungui VJ, Belinga S, Mnika K, Masekoameng T, Nembaware V, Essomba RG, et al. Investigations of Kidney Dysfunction-Related Gene Variants in Sickle Cell Disease Patients in Cameroon (Sub-Saharan Africa). *Front Genet*. 2021;12(March):1–15.
73. Brewin JN, Rooks H, Gardner K, Senior H, Morje M, Patel H, et al. Genome wide association study of silent cerebral infarction in sickle cell disease (HbSS and HbSC). *Haematologica*. 2020;Online ahe.
74. Sales RR, Belisário AR, Faria G, Mendes F, Luizon MR, Viana MB. Functional polymorphisms of BCL11A and HBS1L-MYB genes affect both fetal hemoglobin level and clinical outcomes in a cohort of children with sickle cell anemia. *Ann Hematol*. 2020;99(7):1453–63.
75. Hamda C Ben, Sangeda R, Mwita L, Meintjes A, Nkya S, Panji S, et al. A common molecular signature of patients with sickle cell disease revealed by microarray meta-analysis and a genome-wide association study. *PLoS One*. 2018;13(7):1–21.
76. Jhun EH, Hu X, Sadhu N, Yao Y, He Y, Wilkie DJ, et al. Transient receptor potential polymorphism and haplotype associate with crisis pain in sickle cell disease. *Pharmacogenomics*. 2018;19(5):401–11.

77. Kuo KHM. Multiple testing in the context of gene discovery in sickle cell disease using genome-wide association Studies. *Genomics Insights*. 2017;10(1):1178.
78. Ghia P, Scarf L, Perez S, Pathiraja K, Derosier M, Small K, et al. Genome-wide association study to identify variants associated with acute severe vaso-occlusive pain in sickle cell anemia. *Blood*. 2017;129(13):1876–9.
79. Tumburu L, Thein SL. Genetic control of erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2017;24(3):173–82.
80. Geard A, Pule GD, Chelo D, Bitoungui VJN, Wonkam A. Genetics of sickle cell-associated cardiovascular disease: An expert review with lessons learned in Africa. *Omi A J Integr Biol*. 2016;20(10):581–92.
81. Smith EC, Orkin SH. Hemoglobin genetics: Recent contributions of GWAS and gene editing. *Hum Mol Genet*. 2016;25(R2):R99–105.
82. Leonardo FC, Brugnerotto AF, Domingos IF, Fertrin KY, de Albuquerque DM, Bezerra MAC, et al. Reduced rate of sickle-related complications in Brazilian patients carrying HbF-promoting alleles at the BCL11A and HMIP-2 loci. *Br J Haematol*. 2016;173(3):456–60.
83. Upadhye D, Jain D, Trivedi Y, Nadkarni A, Ghosh K, Colah R. Influence of single nucleotide polymorphisms in the BCL11A and HBS1L-MYB gene on the HbF levels and clinical severity of sickle cell anaemia patients. *Ann Hematol [Internet]*. 2016;95(7):1201–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-016-2675-1>
84. Menzel S, Thein SL. Genetic Modifiers of Fetal Haemoglobin in Sickle Cell Disease. *Mol Diagnosis Ther [Internet]*. 2019;23(2):235–44. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0370-8>
85. Yassa ME-GME, Tousson AMS, El-Hady MA, Mikhaeil E, Mohamed NB, Khorshied MM. Association between BCL11A, HSB1L-MYB, and XmnI  $\gamma$ G-158 (C/T) gene polymorphism and hemoglobin F level in Egyptian sickle cell disease patients. *Ann Hematol*. 2020;99(10):2279–88.
86. Laurentino MR, Barbosa MC, Santos TEJ, Perdigão ACB, Araújo FMC, Lemes RPG. Analysis of BCL11A gene polymorphisms and hemolysis parameters in patients with sickle-cell disease. *J Bras Patol e Med Lab*. 2018;54(3):132–7.
87. Wonkam A, Ngo Bitoungui VJ, Vorster AA, Ramesar R, Cooper RS, Tayo B, et al. Association of variants at BCL11A and HBS1L-MYB with hemoglobin F and hospitalization rates among sickle cell patients in Cameroon. *PLoS One*. 2014;9(3).
88. Mtatiro SN, Makani J, Mmbando B, Thein SL, Menzel S, Cox SE. Genetic variants at HbF-modifier loci moderate anemia and leukocytosis in sickle cell disease in Tanzania. *Am J Hematol*. 2015;90(1):E1–4.
89. Cardoso GL, Diniz IG, Martins da Silva ANL, Cunha DA, da Silva Junior JS, Carvalho Uchôa CT, et al. DNA polymorphisms at BCL11A, HBS1L-MYB and Xmn1-HBG2 site loci associated with fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia patients from Northern Brazil. *Blood Cells, Mol Dis [Internet]*. 2014;53(4):176–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2014.07.006>

90. Adeyemo TA, Ojewunmi OO, Oyetunji IA, Rooks H, Rees DC, Akinsulie AO, et al. A survey of genetic fetal-haemoglobin modifiers in Nigerian patients with sickle cell anaemia. *PLoS One*. 2018;13(6):1–10.
91. Galarneau G, Palmer CD, Sankaran VG, Orkin SH, Hirschhorn JN, Lettre G. Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. *Nat Genet*. 2013;42(12):1049–51.
92. Members of the Complex Trait Consortium. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view Members of the Complex Trait Consortium \*. *Nat Rev Genet*. 2003;4(11):911–6.
93. Wilber A, Nienhuis AW, Persons DA. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: New therapeutic opportunities. *Blood*. 2011;117(15):3945–53.
94. Menzel S, Rooks H, Zelenika D, Mtatiro SN, Gnanakulasekaran A, Drasar E, et al. Global Genetic Architecture of an Erythroid Quantitative Trait Locus, HMIP-2. *Ann Hum Genet*. 2014;78(6):434–51.
95. Stadhouders R, Aktuna S, Thongjuea S, Aghajani-refah A, Pourfarzad F, Van IJcken W, et al. HBS1L-MYB intergenic variants modulate fetal hemoglobin via long-range MYB enhancers. *J Clin Invest*. 2014;124(4):1699–710.
96. Verma HK, Ratre YK, Bhaskar LVKS, Colombatti R. Erythrocyte microRNAs: a tiny magic bullet with great potential for sickle cell disease therapy. *Ann Hematol*. 2021;100:607–14.
97. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(AUG):1–12.
98. Orang AV, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M. Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation. *Int J Genomics*. 2014;2014(June 2013).
99. Byon JCH, Papayannopoulou T. MicroRNAs: Allies or Foes in erythropoiesis? *J Cell Physiol*. 2012;227(1):7–13.
100. Sangokoya C, LaMonte G, Chi J-T. Isolation and Characterization of MicroRNAs of Human Mature Erythrocytes. *Methods Mol Biol*. 2010;(667):193–203.
101. Lawrie CH. MicroRNA expression in erythropoiesis and erythroid disorders. *Br J Haematol*. 2010;150(2):144–51.
102. Khalyfa A, Khalyfa AA, Akbarpour M, Connes P, Romana M, Lapping-Carr G, et al. Extracellular microvesicle microRNAs in children with sickle cell anaemia with divergent clinical phenotypes. *Br J Haematol*. 2016;174(5):786–98.
103. Saki N, Abroun S, Soleimani M, Kaviani-pour M, Shahjehani M, Mohammadi-Asl J, et al. MicroRNA expression in  $\beta$ -Thalassemia and sickle cell disease: A role in the induction of fetal hemoglobin. *Cell J*. 2016;17(4):583–92.
104. Sankaran VG, Menne TF, Scepanovic D, Vergilio J-A, Ji P, Kim J, et al. MicroRNA-15a and -16-1 act via MYB to elevate fetal hemoglobin expression in human trisomy 13. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(4):1519–24.

105. Bianchi N, Zuccato C, Lampronti I, Borgatti M, Gambari R. Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of  $\gamma$ -globin gene expression. *BMB Rep.* 2009;42(8):493–9.
106. Bianchi N, Finotti A, Ferracin M, Lampronti I, Zuccato C, Breveglieri G, et al. Increase of microRNA-210, decrease of raptor gene expression and alteration of mammalian target of rapamycin regulated proteins following mithramycin treatment of human erythroid cells. *PLoS One.* 2015;10(4):1–33.
107. Sarakul O, Vattanaviboon P, Tanaka Y, Fucharoen S, Abe Y, Svasti S, et al. Enhanced erythroid cell differentiation in hypoxic condition is in part contributed by miR-210. *Blood Cells, Mol Dis* [Internet]. 2013;51(2):98–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.03.005>
108. Bavelloni A, Poli A, Fiume R, Blalock W, Matteucci A, Ramazzotti G, et al. PLC-beta 1 regulates the expression of miR-210 during mithramycin-mediated erythroid differentiation in K562 cells. *Oncotarget.* 2014;5(12):4222–31.
109. Sawant M, Chandrakala S, Colah R, Ghosh K, Nadkarni A. Does HbF induction by hydroxycarbamide work through MIR210 in sickle cell anaemia patients? *Br J Haematol.* 2016;173:1–6.
110. Gasparello J, Fabbri E, Bianchi N, Breveglieri G, Zuccato C. BCL11A mRNA Targeting by miR-210: A Possible Network Regulating  $\gamma$ -Globin Gene Expression. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):1–26.
111. Ivan M, Huang X. miR-210: Fine-Tuning the Hypoxic Response. *Adv Exp Med Biol.* 2014;772(1):205–27.
112. Neudecker V, Haneklaus M, Jensen O, Khailova L, Masterson JC, Tye H, et al. Myeloid-derived miR-223 regulates intestinal inflammation via repression of the NLRP3 inflammasome. *J Exp Med.* 2017;214(6):1737–52.
113. Yan Y, Lu K, Ye T, Zhang Z. MicroRNA-223 attenuates LPS-induced inflammation in an acute lung injury model via the NLRP3 inflammasome and TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway via RHOB. *Int J Mol Med.* 2019;43(3):1467–77.
114. Aziz F. The emerging role of miR-223 as novel potential diagnostic and therapeutic target for inflammatory disorders. *Cell Immunol* [Internet]. 2016;303(April):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.04.003>
115. Tristam G, Parslow DP, Sites AI, Terr JBI. *Imunologia médica.* 10th ed. Guanabara Koogan, editor. Rio de Janeiro; 2004. 702 p.
116. Jun-Ming Z, Jianxiong A. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesth Clin.* 2007;45(2).
117. Arend WP. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* 2001;45(1):101–6.
118. Kelso A. Cytokines: Principles and prospects. *Immunol Cell Biol.* 1998;76(4):300–17.
119. Silva-Junior AL, Garcia NP, Cardoso EC, Dias S, Tarragô AM, Fraiji NA, et al. Immunological Hallmarks of Inflammatory Status in Vaso-Occlusive Crisis of Sickle

- Cell Anemia Patients. *Front Immunol.* 2021;12(March):1–14.
120. Zhang D, Xu C, Manwani D, Frenette PS. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood.* 2016;127(7):801–9.
  121. Barbu EA, Mendelsohn L, Samsel L, Thein SL. Pro-inflammatory cytokines associate with NETosis during sickle cell vaso-occlusive crises. *Cytokine* [Internet]. 2020;127(July 2019):154933. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154933>
  122. Da Silva RR, Pereira MC, Melo Rêgo MJB, Domingues Hatzlhofer BL, Da Silva Araújo A, Cavalcanti Bezerra MA, et al. Evaluation of Th17 related cytokines associated with clinical and laboratorial parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine* [Internet]. 2014;65(2):143–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.11.012>
  123. Alagbe AE, Olaniyi JA, Aworanti OW. Adult sickle cell anaemia patients in bone pain crisis have elevated pro-inflammatory cytokines. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2018;10(1):1–9.
  124. Cameron BF, Christian E, Lobel JS, Gaston MH. Evaluation of clinical severity in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc.* 1983;75(5):483–7.
  125. Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2005;129(4):465–81.
  126. Papisavva PL, Papaioannou NY, Patsali P, Kurita R, Nakamura Y, Sitarou M, et al. Distinct mirna signatures and networks discern fetal from adult erythroid differentiation and primary from immortalized erythroid cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7):1–29.
  127. Verma HK, Ratre YK, Bhaskar LVKS, Colombatti R. Erythrocyte microRNAs: a tiny magic bullet with great potential for sickle cell disease therapy. *Ann Hematol.* 2021;100(3):607–14.
  128. Ballas SK, Connes P. Rheological properties of sickle erythrocytes in patients with sickle-cell anemia: The effect of hydroxyurea, fetal hemoglobin, and  $\alpha$ -thalassemia. *Eur J Haematol.* 2018;101(6):798–803.
  129. BYON JCH, PAPAYANNOPOULOU T. MicroRNAs: Allies or Foes in Erythropoiesis? *J Cell Physiol.* 2012;(March 2011):7–13.
  130. Barron N. *MicroRNAs as Tools in Biopharmaceutical Production.* 1st ed. Glasnevin, Dublin; 2012. 124 p.
  131. Carvalho MOS, Araujo-Santos T, Reis JHO, Rocha LC, Cerqueira BAV, Luz NF, et al. Inflammatory mediators in sickle cell anaemia highlight the difference between steady state and crisis in paediatric patients. *Br J Haematol.* 2018;182(6):933–6.

## 9 ORIGINAL PAPER

ORIGINAL PAPER 1

POLYMORPHISMS OF THE GENES BCL11A, HBS1L-MYB, and HBG2-XMN1 PROVIDE A GREATER RISK OF CLINICAL SEVERITY AND ASSOCIATION WITH PHENOTYPIC HETEROGENEITY IN SICKLE CELL ANEMIA.

Ianaê Indira Wilke <sup>1,2</sup>, Daniela Richter<sup>2</sup>, Annelise Pezzi <sup>1,2</sup>, Vanessa Valim <sup>2</sup>, Maria Aparecida da Silva <sup>2</sup>, Bruna Amorim <sup>2</sup>, Filipe Sehn <sup>1,2</sup> Raul Marques Rodrigues <sup>3</sup>, Nicole Kilian<sup>3</sup>, Lúcia Silla <sup>4</sup>.

1. Post-graduation in Medicine: Medical Sciences - Federal University of Rio Grande do Sul.
2. Laboratory of Advanced cell processing center from the Research Center of the Hospital das Clínicas of Porto Alegre
3. Graduation student of the Laboratory of Cell Culture and Molecular Analysis of Hematopoietic Cells of the Research Center of the Hospital of Clinics of Porto Alegre
4. PhD. Professor, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, head of the Laboratory of Cell Culture and Molecular Analysis of Hematopoietic Cells of the Research Center of the Hospital das Clínicas of Porto Alegre.



## ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a hereditary monogenic disease characterized by homozygosity for mutation of the  $\beta$ -globin gene (Hb SS; glu6val). Despite being classified as a monogenic disease, the severity of clinical manifestations in SCA are extremely variable. Identifying genetic risk factors associated with complications and consequent clinical severity may offer targets for new therapies. Within this context, HbF has been characterized as the most important modulator of the clinical and hematological characteristics of the disease, associated with a reduction in clinical manifestations and more serious episodes. HbF levels vary from 10 to 40% depending on the inherited mutations, where 3 main loci seem to control this variation (Xmn1-HBG2, HBS1L-MYB, and BCL11A). Genetic modulation in the gene for the main modulator of SCA severity may constitute mechanisms contributing to this phenotypic variation. Therefore, the objective of our work was to determine whether the genetic polymorphisms of Xmn1-HBG2, BCL11A, and HBS1L-MYB are associated with a risk of developing certain clinical manifestations and a certain severity profile in a population with sickle cell anemia in southern Brazil. This cohort study involved 132 patients with SCA treated at the Sickle Cell Anemia reference center of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The genetic variants were genotyped by amplification of real-time PCR analysis, Taq-Man. The relative risks for the development of each clinical manifestation of the disease and phenotypic severity were calculated for the genotypes in Xmn1-HBG2 (rs7482144); BCL11A (rs1427407, rs4671393, and rs11886868); and HBS1L-MYB (rs9399137 and rs9402686), and their associations were tested. It was concluded that 2 loci have a possible genetic relationship with certain clinical manifestations and levels of HbF distribution and that the presence of specific alleles can attribute increasing risks of clinical complications according to the manifestation of the allele in the genotype. In our findings, the genotype for BCL11A (rs1427407) TT was associated with a 60% higher risk of occurrence of leg ulcers compared to GG (OR = 0.40; 95% CI = 0.15; 1.03 P = 0.050), and 69% higher in relation to GT in the incidence of leg ulcers (OR = 0.31; 95% CI = 0.10; 0.95 P = 0.041). For BCL11A (rs11886868), the risk of occurrence of Acute Chest Syndrome (ACS) was 81% and 89% higher for the CC genotype (OR = 0.19; 95% CI = 0.03; 1.00 P = 0.050 in relation to the genotypes CT and TT respectively (OR = 0.11; 95% CI = 0.01; 0.95 P = 0.045). For splenomegaly, the CT genotype was associated with a 600% higher risk compared to CC (OR = 7.53; 95% IC = 0.46; 125.82 P = 0.034). And, finally, for HBS1L-MYB (rs9399137) TT and HBS1L-MYB (rs9402686) GG was associated with a 10 times greater risk of stroke (OR = 11.44; 95% CI = 0.71; 187, 49 P = 0.012). Thus, our results

suggest a prognostic impact of the presence of certain alleles on the development and worsening of the clinical profile of these patients.

Keywords: Sickle cell anemia, single nucleotide polymorphism, severity.

## INTRODUCTION

Sickle cell anemia is a hemoglobinopathy caused by a point mutation in the  $\beta$ -globin gene. Although classified as a monogenic disease, individuals with this hemoglobinopathy have a pathophysiological alteration that will lead to numerous consequences that lead to very different clinical manifestations (1,2).

It is known that the HbF rate is one of the modulators that has the most significant influence on various complications in the pathophysiology of SCA (3). Understanding the mechanisms involved in the increase in HbF and its correlation with the mitigation of clinical manifestations has been challenging. Although HbF has been the most widely used and effective strategy for modulating clinical manifestations and disease severity, most candidate gene association studies do not include HbF SNPs related to sub-phenotypes (4,5).

Regardless of the clinical manifestations of sickle cell anemia having well-defined characteristics, they are complex, and it is unexpected that they are modulated by a single point mutation, the cause of the disease (Hb SS; glu6val).

Previous studies show that the XmnI-HBG2, HBS1L-MYB, and BCL11A regions are responsible for up to 40% of the HbF variation (6). However, evaluating only HbF levels is not enough to explain the phenotypic diversity of the disease. The analysis of SNPs in the HbF gene for each clinical manifestation may suggest associations with sickle-cell anemia sub-phenotypes, revealing not only genetic associations, but mainly causality.

Given this, we examined 6 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 3 candidate genes to identify genetic polymorphisms associated with the risk of clinical manifestations in patients with sickle cell anemia. We hypothesize that polymorphisms associated with genes of the greatest severity modulator ever described in SCA and the presence of specific alleles may be related to the phenotypic heterogeneity of the disease and its consequent clinical severity, attributing greater risks or probabilities of occurrence.

## MATERIAL AND METHODS

### Sample

This observational cohort study included 132 individuals with HbSS hemoglobinopathy in steady state treated at the Reference Center for Sickle Cell Anemia of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Individuals who received blood transfusions up to 3 months before entering the study or were treated with drugs that stimulate HbF synthesis other than hydroxyurea (HU) were excluded from the study.

### Ethical aspects

The HCPA Research Ethics Committee approved the project under number 2019-0367, and each participant or legal representative signed an informed consent form.

### Clinical Data

Hematological, biochemical, and clinical data were acquired from the hospital services and identified by consulting a database and reviewing medical records.

### DNA Extraction and SNP Genotyping

Genomic DNA was extracted from whole blood using the PureGene Blood kit (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN). Six genetic variants strongly associated with concentrations of HbF already known and validated in the literature were analyzed from possible HbF modifying sites: locus Xmn1-HBG2 (rs7482144); BCL11A (rs1427407, rs4671393, and rs11886868); and in HBS1L-MYB (rs9399137 and rs9402686). These SNPs were genotyped by amplifying real-time PCR analysis (Taq-Man; PE Biosystems, Foster City, CA).

### Statistical Analysis

For categorical data, absolute and relative frequencies were calculated. For normal quantitative data, mean and standard deviation were used. Normality was observed by the Shapiro-Wilk test, followed by the Kruskal-Wallis test, used to compare more than 2 variables. The relative risk was calculated using Poisson regression to explore interactions associated with clinical severity and risk factors for the association between genotypes and the rate of occurrence of clinical manifestations. Hardy-Weinberg balance test was also used, in which it was verified whether the frequencies of alleles and genotypes were constant in the studied

population. After analysis of relative risk, genotype association tests and the distribution of HbF levels were performed. For the analyses, the software SPSS version 20.0 (SPSS, Chicago, IL) was used. The significance level was set at  $p < 0.05$  and 95% power.

## RESULTS

A total of 132 individuals with sickle cell anemia were studied. The clinical and laboratory characteristics of the study are shown in the supplementary data, tables S1 and S2. The median age group of our population was 33 years old, ranging from 7 to 73 years old, and the female gender was predominant with 54.5%. Of the patients included in the study, 12.1% had strokes, 18.2% bone necrosis, 15.2% leg ulcers, 83.3% pain crises, 5.3% sepsis, 5.3% ACS, 6.8 % pulmonary hypertension, 9.8% splenomegaly, 43.9% infections, 3% developmental delay, 2.3% pancreatitis, 14.4% cholelithiasis, 4.5% hepatosplenomegaly, 3% seizures, 4.5% cardiomegaly and 75.1% developed up to 3 complications, while 24.9% had more than 3 complications.

All SNPs studied were in balance for Hardy-Weinberg. Contingency tables were prepared for each SNP for the genotypes under study and the occurrence of each clinical manifestation. For the association of genotypes with the occurrence index, the relative risk was calculated, whose characteristic is to analyze the number of times the event occurs among all individuals observed for each genotype.

We investigated the association between polymorphisms and clinical phenotypes presented by patients with sickle cell anemia. The distributions of genotypes for SNPs were significantly different between some groups and appear to be linked to risk factors for the incidence of some clinical manifestations. However, the frequency of clinical events ( $<3$  or  $>3$ ) does not appear to be associated with the predominance of a single genotype. Because both individuals with more than 3 clinical manifestations and those with less than 3, had a similar predominance for the same genotype in each of the SNPs studied (Graph 1A, B, C, D, E, F).

Subsequently, to analyze the real probability of these events occurring in each genotype, we investigated the risk association between the genotypes and the clinical phenotypes observed in these individuals. The group was initially classified according to the presence or absence of

each complication, and with the distribution of the genotypes, the relative risk analysis was carried out using the Poisson Regression statistical method (Table 1).

In our sample, 14.5% of individuals with GG genotype in SNP rs1427407 in BCL11A developed leg ulcers, compared with 11.1% of individuals with GT genotype and 36.4% of individuals with TT genotype. Thus, according to Poisson regression analyses, the relative risk of an individual developing leg ulcers is 60% lower for the GG genotype ( $p = 0.05$ ), with a confidence interval ranging from 0.15 to 1.03 and 69% lower for individuals with the GT genotype ( $p = 0.04$ ), with a confidence interval of 0.10 to 0.95 concerning the TT genotype.

In ACS analyses, the frequency of clinical manifestation was significantly higher in patients with the CC genotype (57.1%) ( $p = 0.01$ ) compared with patients with the CT (28.5%) and TT genotype (14.4%), representing 17.4% of individuals with the CC genotype for SNP rs11886868 in BCL11A compared to 3.4% of individuals with the CT genotype and 2.0% of individuals with the TT genotype. The chances of developing ACS, therefore, were 81% and 89% significantly lower in individuals with the CT genotype (95% CI = 0.03; 1.0 and  $p = 0.05$ ) and TT (95% CI = 0.01; 0.95 and  $p = 0.04$ ) respectively in relation to individuals with CC genotype.

Regarding splenomegaly, among the patients who developed the manifestation, the frequency was 69.2% higher in patients with CT genotype compared to 30.8% (TT) and 0% (CC). Of the total of each genotype, 7.8% of the individuals who developed splenomegaly presented the TT genotype in the SNP rs11886868 in BCL11A, compared with 15.5% of the individuals with the CT genotype and 0% of the individuals with the CC genotype. Thus, according to the Poisson regression analyses, the relative risk of an individual developing the manifestation is 300% higher for the TT genotype and significantly 650% higher for individuals who have the CT genotype ( $p = 0.03$ ), concerning the CC genotype.

The frequency of stroke in SNP HBS1L-MYB (rs9399137) was significantly higher in patients with the TT genotype (100%) compared with the CT + CC genotypes (0%) ( $p = 0.04$ ). Thus, 16.3% of individuals with TT genotype in the SNP HBS1L-MYB (rs9399137) developed stroke, compared to 0.0% of individuals with CT + CC genotype. Hence, the relative risk of an individual developing stroke is 10 times greater (95% CI = 0.71; 187.49  $P = 0.012$ ) for the TT genotype.

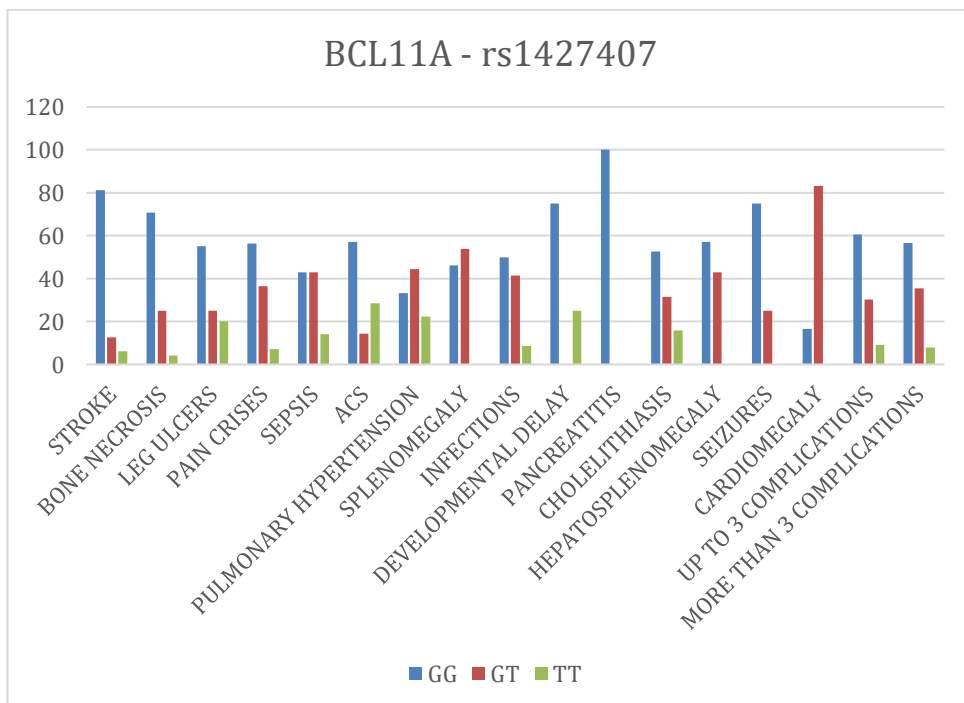
The same occurs in HBS1L-MYB (rs9402686) for the GG genotype, which was associated with a 10 times greater risk of stroke (OR = 11.44; 95% CI = 0.71; 187.49 P = 0.012) and presented a significantly higher frequency of occurrence of the manifestation in patients with GG genotype (100%) compared to AG + AA (0%) (p = 0.04).

With the analysis of relative risk, it was observed that the genetic relationships with each clinical manifestation tend to be associated with the presence of alleles that alone or combined attribute increasing risks or greater probabilities of manifestation according to the number of the allele in the genotype.

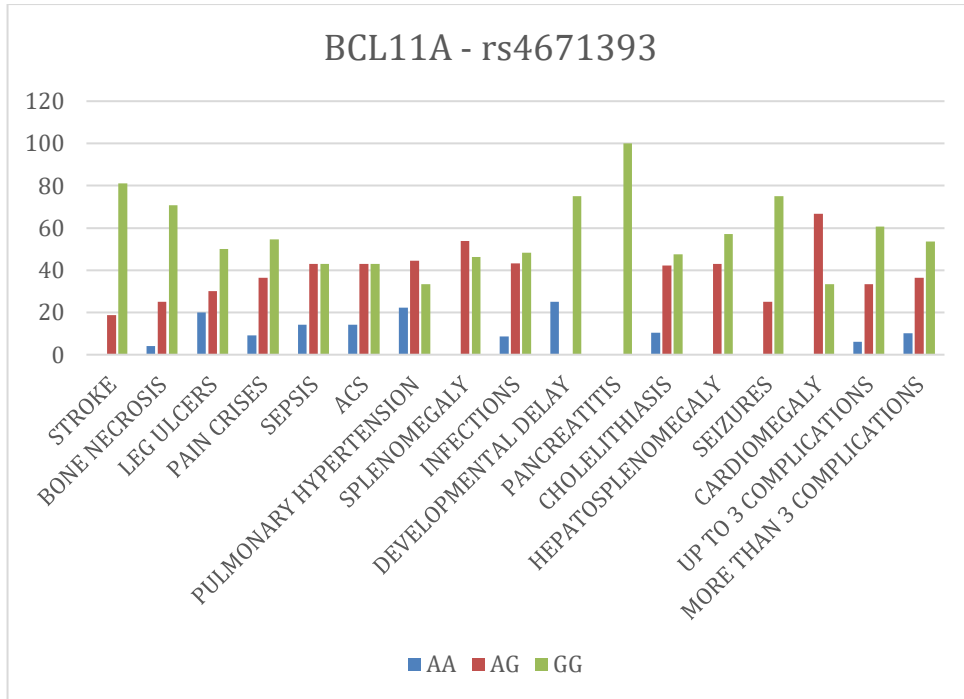
One of the limitations of this study is precisely the low frequency of some manifestations, which may have limited the evidence of association. However, genotypes with non-significant p-values may provide a new path for genotype-phenotype studies in future research.

Graph 1: Frequency of genotypes associated with clinical manifestations

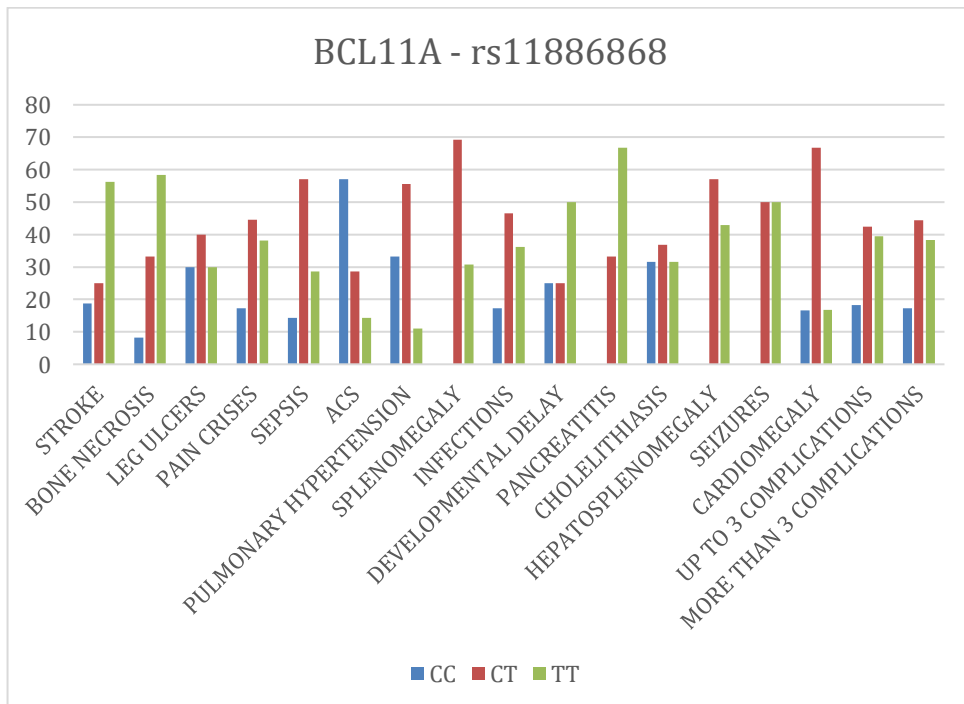
A)



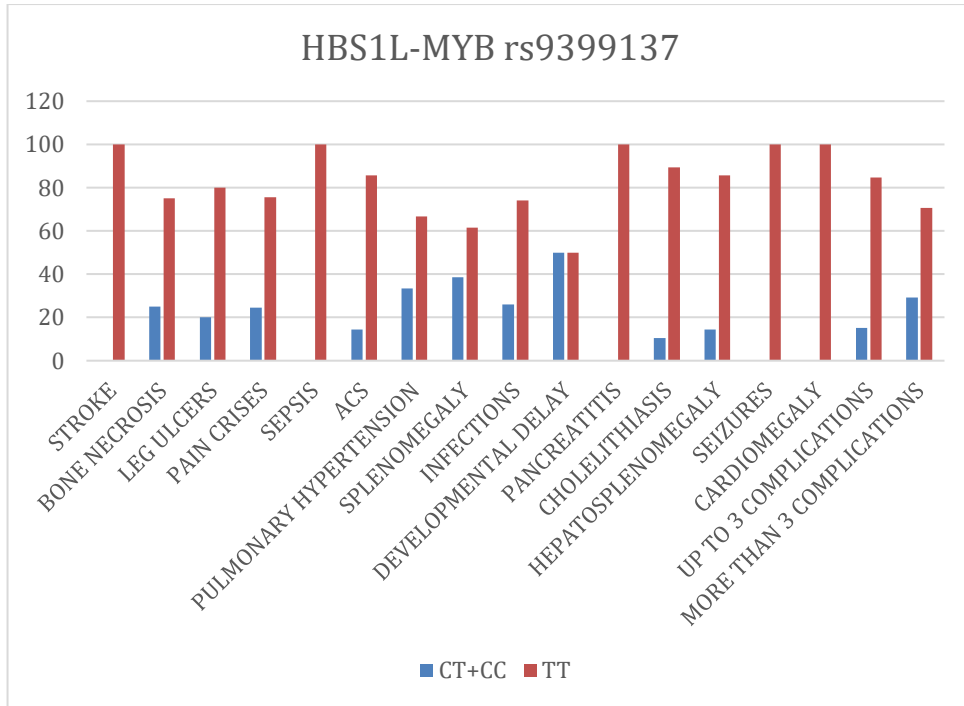
B)



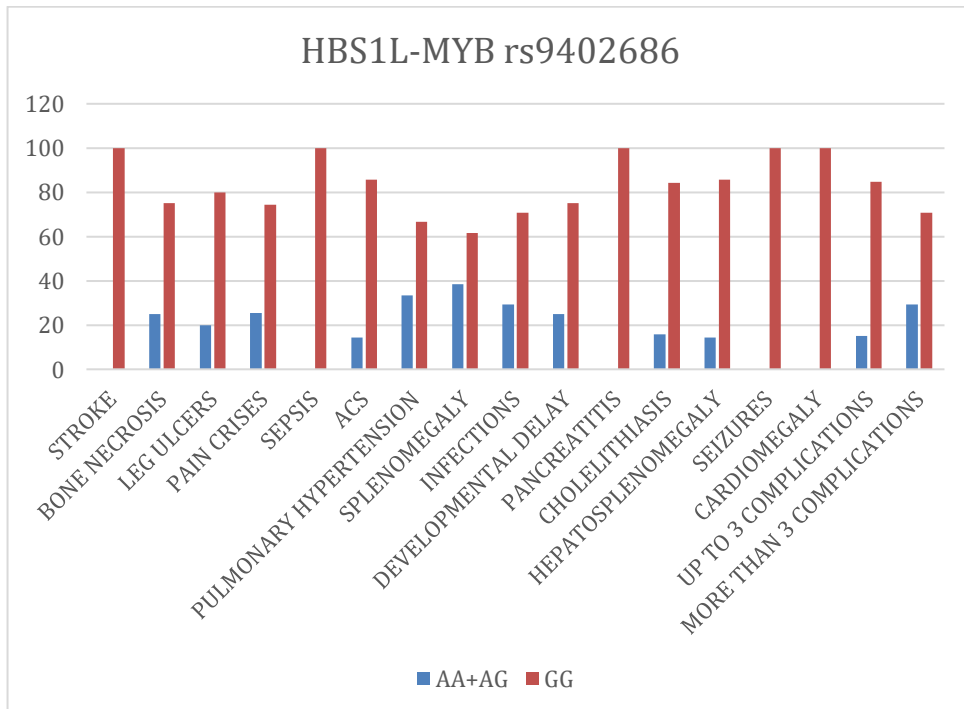
C)



D)



E)





F)

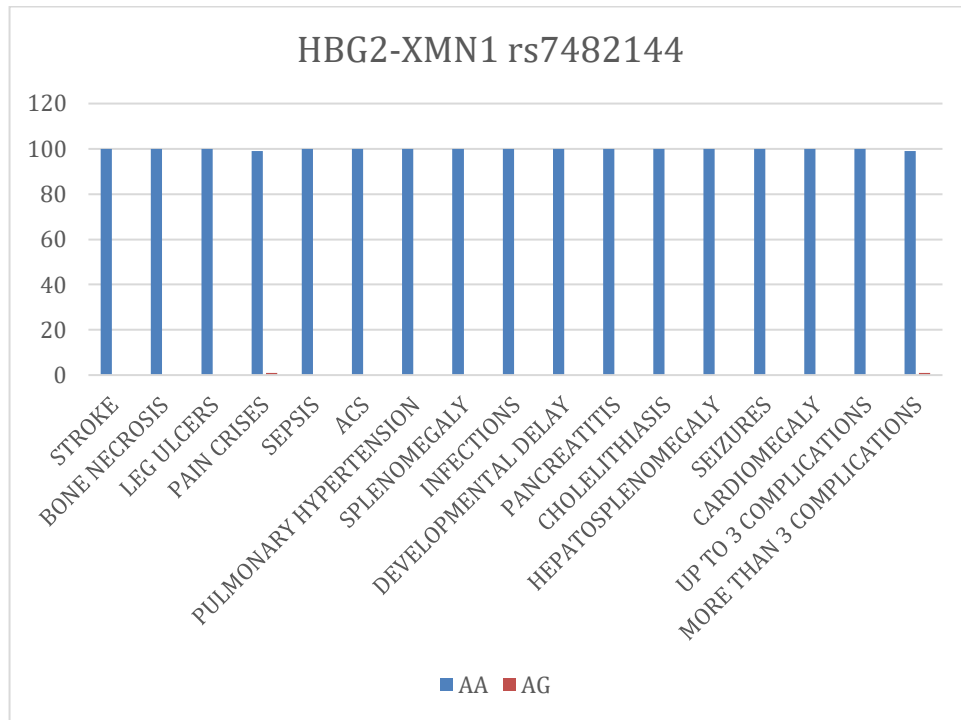


Table 1: risk association between the genotypes and the clinical phenotypes

	BCL11A_rs1427407			BCL11A_rs4671393			BCL11A_rs11886868			HBS1LMYB_rs9399137	HBS1LMYB_rs9402686		
	TT	GG	GT	AA	AG	GG	CC	CT	TT	CT + CC	TT	AG + AA	GG
STROKE	9.1%	17.1%	4.4%	0,00%	6,40%	17,80%	13%	6,90%	17,60%	0,00%	16,30%	0,00%	16,30%
RP (IC95%)	1	1,88 (0,27;13,00)	0,49 (0,05;4,92)	1	1,78 (0,10;33,29)	4,43 (0,29;72,25)	1	0,52 (0,12;2,18)	1,35 (0,40;4,53)	1	11,44 (0,71;187,49)	1	11,44 (0,71;187,49)
p (siq)	-	0,522	0,543	-	0,751	0,14	-	0,378	0,624	-	<b>0,012*</b>	-	<b>0,012*</b>
BONE NECROSIS	9.1%	22.4%	13.3%	8,30%	12,80%	23,30%	8,70%	13,80%	27,50%	17,60%	18,40%	17,60%	18,40%
RP (IC95%)	1	2,46 (0,36;16,70)	1,47 (0,20;10,96)	1	1,53 (0,20;11,54)	2,79 (0,40;19,10)	1	1,58 (0,36;6,91)	3,15 (0,78;12,76)	1	1,04 (0,45;2,40)	1	1,04 (0,45;2,40)
p (siq)	-	0,357	0,709	-	0,679	0,295	-	0,539	0,107	-	0,925	-	0,925
LEG ULCERS	36.4%	14.5%	11.1%	33,30%	12,80%	13,70%	26,10%	13,80%	11,80%	11,80%	16,30%	11,80%	16,30%
RP (IC95%)	1	0,40 (0,15;1,03)	0,31 (0,10;0,95)	1	0,38 (0,12;1,14)	0,41 (0,15;1,10)	1	0,52 (0,20;1,35)	0,45 (0,16;1,24)	1	1,38 (0,49;3,86)	1	1,38 (0,49;3,86)
p (siq)	-	<b>0,05</b>	<b>0,041*</b>	-	0,086	0,077	-	0,185	0,126	-	0,53	-	0,53
PAIN CRISIS	72.7%	81.6%	88.9%	83,30%	85,10%	82,20%	82,60%	84,50%	82,40%	79,40%	84,70%	82,40%	83,70%
RP (IC95%)	1	1,12 (0,77;1,63)	1,22 (0,84;1,78)	1	1,02 (0,77;1,35)	0,98 (0,75;1,29)	1	1,02 (0,82;1,27)	0,99 (0,79;1,25)	1	1,06 (0,88;1,29)	1	1,01 (0,85;1,21)
p (siq)	-	0,551	0,296	-	0,883	0,922	-	0,84	0,979	-	0,508	-	0,861
SEPSIS	9.1%	3.9%	6.7%	8,30%	6,40%	4,10%	4,30%	6,90%	3,90%	0,00%	7,10%	0,00%	7,10%
RP (IC95%)	1	0,43 (0,05;3,81)	0,73 (0,08;6,39)	1	0,76 (0,08;6,72)	0,49 (0,05;4,35)	1	1,58 (0,18;13,44)	0,90 (0,08;9,45)	1	5,20 (0,30;89,56)	1	5,20 (0,30;89,56)
p (siq)	-	0,452	0,779	-	0,81	0,525	-	0,672	0,931	-	0,235	-	0,235
ACS	18.2%	5.3%	2.2%	8,30%	6,40%	4,10%	17,40%	3,40%	2,00%	2,90%	6,10%	2,90%	6,10%

RP (IC95%)	1	0,29 (0,06;1,40)	0,12 (0,01;1,23)	1	0,76 (0,08;6,72)	0,49 (0,05;4,35)	1	0,19 (0,03;1,0)	0,11 (0,01;0,95)	1	2,08 (0,26;16,67)	1	2,08 (0,26;16,67)
p (siq)	-	0,123	0,074	-	0,81	0,525	-	<b>0,05</b>	<b>0,045*</b>	-	0,49	-	0,49
PULMONARY HYPERTENSION	18.2%	3.9%	8.9%	16,70%	8,50%	4,10%	17,40%	43,90%	38,60%	8,80%	6,10%	8,80%	6,10%
RP (IC95%)	1	0,22 (0,04;1,16)	0,49 (0,10;2,34)	1	0,51 (0,10;2,46)	0,24 (0,04;1,32)	1	0,66 (0,17;2,54)	0,15 (0,01;1,36)	1	0,69 (0,18;2,62)	1	0,69 (0,18;2,62)
p (siq)	-	<b>0,074</b>	0,37	-	0,403	0,103	-	0,547	0,093	-	0,59	-	0,59
SPLENOMEGALY	.0%	7.9%	15.6%	0%	14,90%	8,20%	0,00%	15,50%	7,80%	14,70%	8,20%	14,70%	8,20%
RP (IC95%)	1	1,88 (0,11;32,33)	3,66 (0,23;61,46)	1	3,83 (0,24;64,37)	2,13 (0,13;36,75)	1	7,53 (0,46;125,82)	4,05 (0,23;73,15)	1	0,55 (0,19;1,58)	1	0,55 (0,19;1,58)
p (siq)	-	0,216	0,098	-	0,233	0,393	-	<b>0,034*</b>	0,195	-	0,271	-	0,271
INFECTIONS	45.5%	38.2%	53.3%	41,70%	53,20%	38,40%	43,50%	46,60%	41,20%	44,10%	43,90%	50%	41,80%
RP (IC95%)	1	0,84 (0,41;1,70)	1,17 (0,58;2,37)	1	1,27 (0,62;2,62)	0,92 (0,44;1,91)	1	1,07 (0,62;1,84)	0,94 (0,53;1,67)	1	0,99 (0,64;1,54)	1	0,83 (0,55;1,26)
p (siq)	-	0,628	0,656	-	0,507	0,824	-	0,805	0,852	-	0,981	-	0,393
DEVELOPMENT DELAY	9.1%	3.9%	0.0%	8,30%	0,00%	4,10%	4,30%	1,70%	3,90%	5,90%	0,00%	2,90%	3,10%
RP (IC95%)	1	0,43 (0,49;3,81)	0,08 (0,004;1,93)	1	0,08 (0,004;2,02)	0,49 (0,05;4,35)	1	0,39 (0,02;6,07)	0,90 (0,08;9,45)	1	0,34 (0,05;2,36)	1	1,04 (0,11;9,67)
p (siq)	-	0,25	0,098	-	0,102	0,278	-	0,507	0,931	-	0,28	-	0,972
PANCREATITIS	0%	3,90%	0%	0%	0%	4,10%	0,00%	1,70%	3,90%	0,00%	3,10%	0,00%	3,10%
RP (IC95%)	1	1,01 (0,05;19,02)	0,99 (0,31;3,135)	1	0,99 (0,31;3,13)	1,15 (0,06;21,62)	1	1,19 (0,05;28,51)	2,25 (0,11;45,65)	1	2,42 (0,13;46,25)	1	2,42 (0,13;46,25)
p (siq)	-	0,66	0,994	-	0,996	0,685	-	0,642	0,764	-	0,812	-	0,812
CHOLELITHIASIS	27.3%	13.2%	13.3%	16,70%	17,00%	12,30%	26,10%	12,10%	11,80%	5,90%	17,30%	8,80%	16,30%
RP (IC95%)	1	0,48 (0,16;1,49)	0,49 (0,14;1,65)	1	1,02 (0,24;4,19)	0,74 (0,18;3,01)	1	0,46 (0,17;1,23)	0,45 (0,16;1,24)	1	2,94 (0,71;12,10)	1	1,85 (0,57;5,96)

p (siq)	-	0,204	0,25	-	0,977	0,674	-	0,122	0,126	-	0,133	-	0,303
HEPATOSPLENOMEGALY	.0%	5.3%	6.7%	0%	6,40%	5,50%	0,00%	6,90%	5,90%	2,90%	6,10%	2,90%	6,10%
RP (IC95%)	1	1,30 (0,07;23,44)	1,71 (0,09;31,80)	1	1,78 (0,10;33,29)	1,47 (0,08;26,65)	1	3,56 (0,20;64,50)	3,15 (0,17;59,34)	1	2,08 (0,26;16,67)	1	2,08 (0,26;16,67)
p (siq)	-	0,712	0,744	-	0,751	0,731	-	0,446	0,387	-	0,49	-	0,49
SEIZURE	.0%	3.9%	2.2%	0%	2,10%	4,10%	0,00%	3,40%	3,90%	0,00%	4,10%	0,00%	4,10%
RP (IC95%)	1	1,01 (0,05;19,02)	0,73 (0,03;17,37)	1	0,76 (0,03;18,18)	1,15 (0,06;21,62)	1	1,98 (0,10;40,25)	2,25 (0,11;45,65)	1	3,12 (0,17;57,03)	1	3,12 (0,17;57,03)
p (siq)	-	0,668	0,598	-	0,602	0,685	-	0,745	0,764	-	0,598	-	0,598
CARDIOMEGALY	.0%	1.3%	11.1%	0%	8,50%	2,70%	4,30%	6,90%	2,00%	0,00%	6,10%	0,00%	6,10%
RP (IC95%)	1	0,43 (0,02;10,39)	2,68 (0,16;46,59)	1	2,29 (0,13;41,03)	1,14 (0,04;17,40)	1	1,58 (0,18;13,44)	0,45 (0,02;6,89)	1	4,51 (0,26;78,70)	1	4,51 (0,26;78,70)
p (siq)	-	0,563	0,411	-	0,377	0,632	-	0,672	0,567	-	0,322	-	0,322
NUMBER OF COMPLICATIONS (>3)	27.3%	26.3%	22.2%	16,70%	23,40%	27,40%	26,10%	24,10%	25,50%	14,70%	28,60%	14,70%	0,286
RP (IC95%)	1	0,96 (0,34;2,72)	0,81 (0,27;2,47)	1	1,40 (0,35;5,50)	1,64 (0,44;6,14)	1	0,92 (0,40;2,11)	0,97 (0,42;2,24)	1	1,94 (0,81;4,62)	1	1,94 (0,81;4,62)
p (siq)	-	0,946	0,717	-	0,626	0,46	-	0,854	0,957	-	0,134	-	0,134

RP (prevalence ratio) >1 ou < 1 indicates the increase or decrease in risk, respectively, of the occurrence of the event. CI, confidence interval.

\* Indicates statistically significant differences.

Subsequently, we postulated the association between genotypes and the distribution of HbF levels, verifying their association with HbF concentrations and their possible influence on modifying the clinical characteristics of the disease. There was a significant association for BCL11A (rs1427407) and HbF levels ( $p = 0.012$ ), also for HBS1L-MYB where the results showed a significant association of rs9399137 ( $p = 0.047$ ) and rs9402686 ( $p = 0.016$ ). Although no significant association was found for BCL11A rs11886868 ( $p = 0.093$ ) and rs4671393 ( $p = 0.088$ ), an association trend was observed (figures 1 and 2).

Our results also highlight the importance of HbF levels in the clinical evolution and phenotypic heterogeneity of the disease. For BCL11A\_rs1427407, the concentration of HbF was associated with higher levels in the TT genotype compared to the GT and GG, corroborating the idea of a milder disease phenotype in this population. On the other hand, in BCL11A\_rs11886868, the concentration was related to lower levels of HbF for TT and with an increase in clinical manifestations in individuals with this genotype.

As for BCL11A\_rs4671393, the AA genotype showed higher levels of HbF, giving a higher probability of a milder profile. For HBS1L\_MYB\_rs9399137 and HBS1L\_MYB\_rs9402686, the TT and GG genotypes, respectively, presented lower levels of HbF, attributing increasing risks or greater probabilities of manifestations and consequent clinical severity. We did not observe an association in HBG2 of rs7482144 with HbF levels.

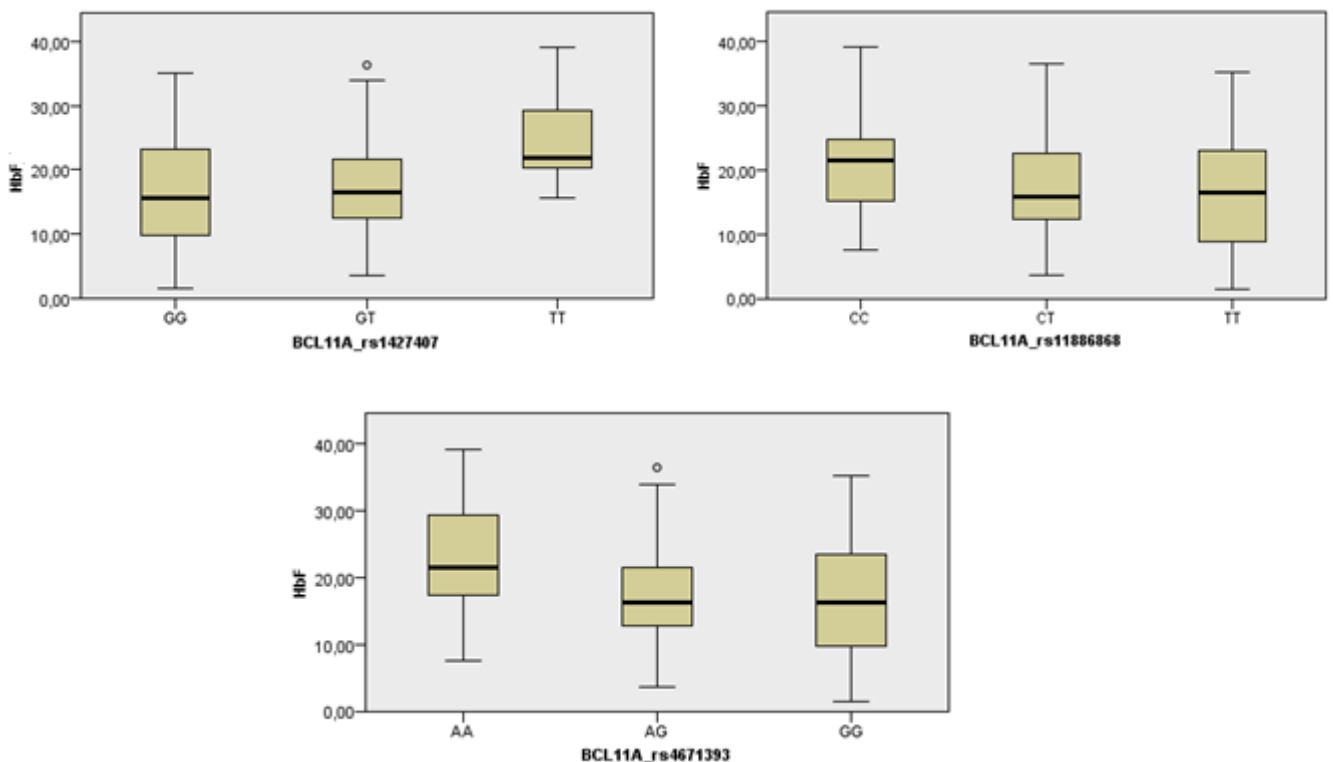


Figure 1. Association between the genotypes of BCL11A\_rs1427407 (p=0.012), BCL11A\_rs4671393 (p=0.088) and BCL11A\_rs11886868 (p=0.093) and the distribution of HbF levels.

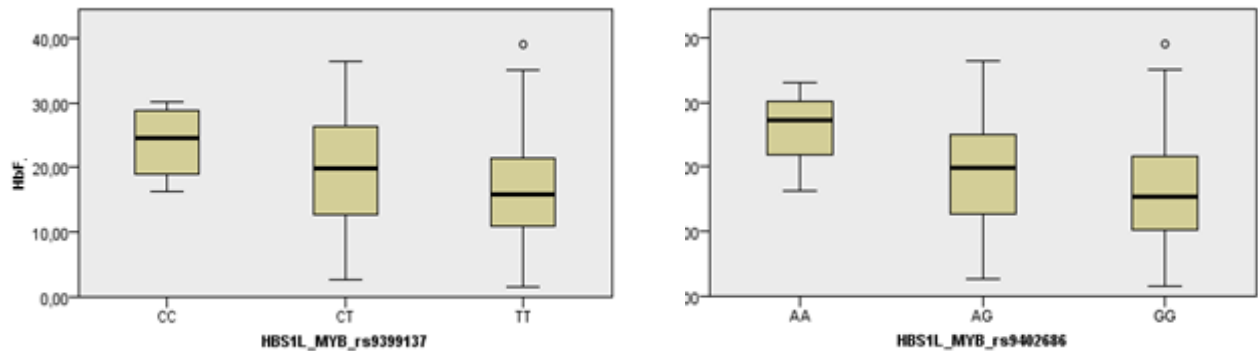


Figure 2. Association between the genotypes of HBS1L\_MYB\_rs9399137 (p=0.09) and HBS1L\_MYB\_rs9402686 (p=0.06) and the distribution of HbF levels.

## DISCUSSION

SCA patients have great variability in HbF concentrations, probably determined by genetic factors. Three main quantitative trait loci (QTLs) are related to HbF concentrations in adulthood, BCL11A and HBS1L-MYB, and regulatory elements of hematopoietic transcription factors, and HBG2-XMN1 belonging to the  $\beta$ -globin gene (7,8). Although many studies confirm the association of SNPs from these loci with HbF levels, the exact contribution of HbF levels to the pathophysiology of SCA remains unclear (9). Few studies have attempted to evaluate the effect of SNPs on these loci on the clinical characteristics of the disease (10).

To identify possible associations between genetic variations and specific characteristics of interest, genome-wide association studies (GWAS) were used (11). Despite the clear evidence of the role of these loci in the regulation of the  $\gamma$ -globin gene, it is not yet clear how the genetic variants act in modulating the severity of the disease.

The BCL11A loci have been the genetic marker most strongly associated with HbF levels, presenting itself as a direct repressor of its production and an essential regulator of the globin gene (6). In BCL11A rs1427407, Bauer and his collaborators reported that the change from the G to T allele became a key regulatory element with functional potential in the variability of HbF levels, showing itself as potentially influential loci, especially when

associated with other markers from the same region as BCL11A\_rs11886868 and BCL11A\_rs4671393 (9,12). In our study, the G allele in the homozygous state was associated with lower levels of HbF; however, the presence of the G allele conferred a lower risk on the development of leg ulcers, showing that HbF may not be functionally and directly related to less incidence of hemolytic manifestations such as leg ulcers. Thus, although the change of allele from G to T is associated with increased HbF levels, the consequent clinical improvement does not apply to all clinical manifestations. In a previous study, Kato and collaborators pointed out that the main clinical benefits observed from the increase in HbF would be associated with those phenotypes related to viscosity and vessel occlusion, mainly due to the anti-sickling effect provided by HbF (13). Thus, we emphasize the importance of understanding the exact contribution of HbF levels in SCA's pathophysiology, especially its influence on certain manifestations, whether they are hemolytic or vaso-occlusion phenotype. The possible influence of specific alleles opens a gap for further studies to understand the importance of the effect of SNPs on the clinical characteristics of the disease.

For rs4671393 in BCL11A, the A allele was associated with increased levels of HbF (11). What validates the findings in our population, where the A allele was also associated with higher levels of HbF, in contrast to the presence of the G allele that led to low levels of HbF, corroborating the idea that the G allele, also in these loci, is an essential regulatory element that leads to a more severe clinical picture of the disease.

A protective effect of the C allele was confirmed by Uda *et al.* (2008), who demonstrated an association of the BCL11A\_rs11886868 allele with high levels of HbF and a better phenotype in patients with sickle cell anemia. Another significant association of homozygosity of the C allele related to a milder clinic was reported by Chaouch *et al.* (2016) e Dadheech *et al.* (2016). In our population, the findings corroborate such evidence since the genotype T in the homozygous state led to an association of low levels of HbF and an increased incidence of complications in relation to the C allele. Except for ACS, which in our study showed an association with the C allele in the increasing incidence.

As for the HBS1L-MYB intergenic region, polymorphisms in this region have been associated with variations in HbF levels and parameters of erythroid cells due to their regulatory role in MYB (17). Its overexpression or suppression is directly related to the inhibition or increase of hemoglobin in erythroid cells. The occurrence of polymorphisms in this region directly affects MYB expression through the GATA transcription factor and, consequently,

HbF levels (17). Our results revealed a significantly higher frequency of stroke in rs9399137 in patients with the TT genotype (100%) compared to the CT + CC genotypes (0%) and in rs9402686 for the GG genotype, which was associated with a risk 10 times greater occurrence of strokes, consolidating with a previous study that demonstrated that the presence of some HbF promoting variants leads to a reduced rate of complications in SCA, especially in the occurrence of strokes, where the presence of allele A in rs9402686 and allele C in rs 9399137 it was sufficient to lead to a protective effect, decreasing the chances of complications occurring (7).

For Xmn1-HBG2 (rs7482144), it was not possible to test associations due to the patients in this population presenting essentially similar variants in all genotypes. Variants for these loci are usually found in Senegalese, Arabian, and Indian haplotypes (18).

Our SNP analyses suggest associations with sickle cell anemia sub-phenotypes, not only revealing genetic associations but mainly causality. Although the rate of clinical manifestations varies substantially between patients, the regions BCL11A (rs1427407), (rs11886868), and HBS1L-MYB (rs9399137) seem to influence the clinical course of the disease. The observed associations suggest that in BCL11A (rs1427407), T / T, (rs11886868), T / T, and CC are risk factors for developing leg ulcers, splenomegaly, and Acute Chest Syndrome, respectively. While for HBS1L-MYB (rs9399137) T / T and (rs9402686) G / G increases the risk of developing stroke. Then, it is suggested that polymorphisms in the BCL11A and HBS1L-MYB loci are possible important risk factors in the clinical course of SCA physiopathology.

However, we emphasize that the number of manifestations in our sample may have limited the evidence of association. We suggest that further studies of the genotype-phenotype association be carried out in larger populations.

When studying the associations between SNPs and the HbF distribution profile, high concentrations have been associated with lighter profiles of the disease. In contrast, lower levels have been shown to be associated with more severe genotypes, leading to an increased incidence of clinical manifestations in these individuals. Studies have associated high levels of HbF with lower manifestations of painful episodes, leg ulcers, osteonecrosis, acute chest syndrome, and consequently less disease severity. However, there was no evidence of an association with stroke and priapism. Such difference in the influence of HbF on clinical manifestations can be explained by the dependence of some factors: hemolysis of erythrocytes, which release heme and consequently nitrous oxide providing endothelial damage; or the



dependence of some manifestations on the polymerization of HbS, being dependent on other mediators such as inflammatory cytokines (5,19).

Thus, we hypothesize that these loci play a fundamental role in the variability of HbF and the consequent clinical variability in a polygenic and related manner. We demonstrated that genotype variations and the presence of specific alleles might be attributing increasing risks to certain clinical manifestations, leading to distinct phenotypic heterogeneity and severity profile. The presence of certain genotypes may be responsible for an increase in HbF levels. We identified variants that could explain such effects, and our results showed consistency with studies carried out in other populations. Thus, it reinforces the relevance of our results by the variability and discrepancy of phenotypes currently found in different regions of the world and the current use of standard therapy, which can be individualized.

In addition, studies have already inferred that the levels of mortality in SCA are inversely correlated with the levels of HbF (20,21). Given the importance of the influence of genotypes on HbF levels, on the clinical and severity measures shown by our study, it is crucial to carry out further research that assigns a global phenotype that allows inferring a phenotypic stratification with a potential prognosis of severity for the disease.

Therefore, additional studies with larger samples and the association of other variables are necessary for developing a genetic marker profile for the disease that may lead to individualization in clinical decision-making. Identifying genetic, laboratory, and inflammatory factors associated with each clinical manifestation and its contribution to disease severity and morbidity, and mortality may lead to more effective therapies according to each complication and phenotype.

## CONCLUSION

We conclude that specific alleles in HbF genes seem to play an essential role in the clinical course of the disease that still needs to be clarified. The outcome observed in this study, evidenced by the increasing risks or greater probabilities of manifestations and the consequent clinical severity according to the frequency of specific alleles, shows the need for more extensive studies that can lead to the contribution of these genetic factors in the modulation of

the clinical severity of the disease, aiming at a promising potential for clinical and therapeutic utility.

#### DECLARATION OF CONFLICTS OF INTERESTS

The author (s) have declared no potential conflict of interest concerning the research, authorship and/or publication of this article.

#### REFERENCES

1. Johnson CS. Sickle-Cell Disease. *Int Encycl Public Heal* [Internet]. 2016;376(9757):506–12. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61029-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61029-X)
2. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2017;376(16):1561–73.
3. Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of fetal hemoglobin: New insights emerging from genomics and clinical implications. *Hum Mol Genet*. 2009;18(R2):216–23.
4. Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin CT, Sebastiani P, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*. 2011;118(1):19–27.
5. Steinberg MH, Chui DHK, Dover GJ, Sebastiani P, Alsultan A. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: A glass half full? *Blood*. 2014;123(4):481–5.
6. Galarneau G, Palmer CD, Sankaran VG, Orkin SH, Hirschhorn JN, Lettre G. Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. *Nat Genet*. 2013;42(12):1049–51.
7. Leonardo FC, Brugnerotto AF, Domingos IF, Fertrin KY, de Albuquerque DM, Bezerra MAC, et al. Reduced rate of sickle-related complications in Brazilian patients carrying HbF-promoting alleles at the BCL11A and HMIP-2 loci. *Br J Haematol*. 2016;173(3):456–60.
8. Upadhye D, Jain D, Trivedi Y, Nadkarni A, Ghosh K, Colah R. Influence of single nucleotide polymorphisms in the BCL11A and HBS1L-MYB gene on the HbF levels and clinical severity of sickle cell anaemia patients. *Ann Hematol* [Internet]. 2016;95(7):1201–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-016-2675-1>
9. Menzel S, Thein SL. Genetic Modifiers of Fetal Haemoglobin in Sickle Cell Disease. *Mol Diagnosis Ther* [Internet]. 2019;23(2):235–44. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0370-8>
10. Sheehan VA, Luo Z, Flanagan JM, Howard TA, Thompson BW, Wang WC, et al. Genetic modifiers of sickle cell anemia in the baby hug cohort: Influence on laboratory and clinical phenotypes. *Am J Hematol*. 2013;88(7):571–6.

11. Pace BS, Lopez NH, Zhu X, Li B. Precision Medicine for Sickle Cell Disease: Discovery of genetic targets for drug development. *Heavy Met Remov with Phytoremediation*. 2016;i(tourism):13.
12. Bauer DE, Kamran SC, Lessard S, Xu J, Fujiwara Y, Lin C, et al. A erythroid enhancer of BCL11A subject t genetic variation. 2014;342(6155):253–7.
13. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*. 2007;21(1):37–47.
14. Uda M, Galanello R, Sanna S, Lettre G, Sankaran VG, Chen W, et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of  $\beta$ -thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(5):1620–5.
15. Dadheech S, Madhulatha D, Jain S, Joseph J, Jyothy A, Munshia\* A. Association of BCL11A genetic variant (rs11886868) with severity in  $\beta$ -thalassaemia major & sickle cell anaemia. *Indian J Med Res*. 2016;143(4):449–54.
16. Chaouch L, Moumni I, Ouragini H, Darragi I, Kalai M, Chaouachi D, et al. rs11886868 and rs4671393 of BCL11A associated with HbF level variation and modulate clinical events among sickle cell anemia patients. *Hematology*. 2016;21(7):425–9.
17. Wilber A, Nienhuis AW, Persons DA. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: New therapeutic opportunities. *Blood*. 2011;117(15):3945–53.
18. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MC, Araujo AS, Uda M, Sanna S, et al. Globin Loci Associate With Fetal Hemoglobin Levels and Pain Crises in Sickle Cell Disease. *Pnas* [Internet]. 2008;105(33):1–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2491485&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
19. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest*. 2017;127(3):750–60.
20. Ma Q, Wyszynski DF, Farrell JJ, Kutlar A, Farrer LA, Baldwin CT, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Genetic determinants of response to hydroxyurea. *Pharmacogenomics J*. 2007;7(6):386–94.
21. Rosell R, Gomez-Codina J, Camps C, Maestre JA, Padille J, Cantó A, et al. Mortality in sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1994;330(3):153–8.

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1. Baseline characteristics of patients with SCA according to the polymorphisms BCL11A rs1427407, BCL11A rs4671393 and BCL11A rs11886868.

HbSS (n = 132)	BCL11A rs1427407				BCL11A rs4671393				BCL11A rs11886868			
	TT	GT	GG	p	AA	AG	GG	p	CC	CT	TT	p
	(n = 11)	(n =45)	(n = 76)		(n =12)	(n =47)	(n =73)		(n = 23)	(n =58)	(n = 51)	
No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	No.	
TGO (mean)	34	38	40	0,649	37	36	41	0,516	37	38	41	0,697
TGP (mean)	23	23	27	0,91	24	22	28	0,395	26	24	28	0,558
Bilirubin (mean)	2,4	2,7	1,9	<b>0,005*</b>	2,7	2,4	2	0,085	2,3	2,3	2,1	0,784
Urea (mean)	27	25	22	0,519	26	25	22	0,776	29	23	22	0,213
Creatinine (mean)	0,65	0,5	0,47	0,109	0,59	0,51	0,47	0,407	0,58	0,51	0,45	0,232
Hb Total (mean)	9,3	8,4	8,3	0,143	8,8	8,4	8,3	0,641	8,8	8,3	8,3	0,453
HbF (mean)	23,9	17,5	18,3	0,128	24	17,3	18,4	0,086	21,2	18	17,8	0,267
LDH (mean)	746	859	880	0,214	798	841	886	0,501	719	894	890	0,068
VCM (mean)	105,7	95,2	94	<b>0,036*</b>	102,8	95	94,4	0,2	101,6	94	94,1	<b>0,049*</b>
Platelets (mean)	345	384	371	0,846	346	387	369	0,682	364	382	367	0,431
Reticulocytes (mean)	7	12	11	<b>0,036*</b>	8	12	11	0,125	10	11	11	0,562
Leukocytes (mean)	8,7	9,9	10,1	0,271	9,5	9,9	10	0,787	8,8	10,1	10,3	0,12

Note. The data values are expressed as an average. TGO = glutamic-oxalacetic transaminase; TGP = glutamic-pyruvic transaminase; Hb = hemoglobin; Hb F = fetal hemoglobin; LDH = lactate dehydrogenase; MCV = Average corpuscular volume.

\* Indicates statistically significant differences.

Table S2. Baseline characteristics of patients with SCA according to the HBS1L-MYB rs 9399137, HBS1L-MYB rs 9402686 and HBG2 Xmn1 rs7482144 polymorphisms.

HbSS (n = 132)	HBS1L-MYB rs 9399137				HBS1L-MYB rs 9402686				HBG2 Xmn1 rs7482144		
	TT (n =98)	CT (n =30)	CC (n = 4)	p	GG (n =98)	AG (n =29)	AA (n =5)	p	AA (n = 131)	AG (n =1)	p
	No.	No.	No.		No.	No.	No.		No.	No.	
TGO (mean)	39	38	37	0,872	40	38	35	0,858	39	27	0,455
TGP (mean)	25	29	18	0,718	25	27	20	0,828	26	15	0,606
Bilirubin (mean)	2,3	2,1	1,7	0,735	2,2	2,4	1,8	0,66	2,2	1,6	0,697
Urea (mean)	25	20	20	0,224	24	20	21	0,306	23	17	0,591
Creatinine (mean)	0,52	0,46	0,31	<b>0,020*</b>	0,52	0,45	0,31	0,004*	0,5	0,55	0,576
Hb Total (mean)	8,4	8,2	8,5	0,587	8,5	8,1	8,9	0,248	8,4	8,8	0,697
HbF (mean)	17,7	20	27,3	0,091	17,8	19	28,5	0,067	18,5	25,2	0,409
LDH (mean)	836	937	942	0,208	843	915	911	0,352	862	839	0,879
VCM (mean)	95,8	95	86,9	0,294	95,7	96,1	84,3	0,121	95,5	78,1	0,258
Platelets (mean)	366	393	398	0,706	362	413	361	0,753	375	155	0,061
Reticulocytes (mean)	11	11	8	0,612	11	12	8	0,345	11	4	0,212
Leukocytes (mean)	9,5	11,1	11,1	0,276	9,7	10,8	10	0,302	9,8	22,7	0,061

Note. The data values are expressed as an average. TGO = glutamic-oxalacetic transaminase; TGP = glutamic-pyruvic transaminase; Hb = hemoglobin; Hb F = fetal hemoglobin; LDH = lactate dehydrogenase; MCV = Average corpuscular volume.

\* Indicates statistically significant differences.

ORIGINAL PAPER 2

**POTENTIAL PREDICTIVE VALUE OF MICRORNAS EXPRESSION IN THE ASSESSMENT OF THE SEVERITY AND PHENOTYPIC HETEROGENEITY OF SICKLE CELL ANEMIA**

Ianaê Indira Wilke <sup>1,2</sup>, Daniela Richter<sup>2</sup>, Annelise Pezzi <sup>1,2</sup>, Vanessa Valim <sup>2</sup>, Maria Aparecida da Silva <sup>2</sup>, Bruna Amorim <sup>2</sup>, Filipe Sehn <sup>1,2</sup> Raul Marques Rodrigues <sup>3</sup>, Nicole Kilian<sup>3</sup>, Lúcia Silla <sup>4</sup>.

1. Post-graduation in Medicine: Medical Sciences - Federal University of Rio Grande do Sul.
2. Laboratory of Cell Culture and Molecular Analysis of Hematopoietic Cells from the Research Center of the Hospital das Clínicas of Porto Alegre
3. Graduation student of the Laboratory of Cell Culture and Molecular Analysis of Hematopoietic Cells of the Research Center of the Hospital of Clinics of Porto Alegre
4. PhD. Professor, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, head of the Laboratory of Cell Culture and Molecular Analysis of Hematopoietic Cells of the Research Center of the Hospital das Clínicas of Porto Alegre.

Correspondence:

Professora Dra. Lucia Silla, MD, PhD

Laboratório de Cultura Celular e Análise Molecular de Células Hematopoiéticas

Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcellos, 2350

CEP: 90035-903- Porto Alegre/RS, Brasil

Phone number: +55 (51) 3359-8317

E-mail: lsilla@hcpa.ufrgs.br

## ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is the most prevalent monogenic hereditary disease in Brazil, characterized by a high morbidity and mortality rate. A point mutation in the hemoglobin beta-globin gene is the cause of the disease. Genetic characteristics of individuals, in addition to the possible heterogeneity of molecules associated with hemolysis and vasculopathy, are responsible for a variety of clinical manifestations and complications. The treatments currently available consist of mitigating clinical manifestations and reducing the number of crises for a better quality of life for these patients. Small regulators of gene transcription appear to play an important role in the pathophysiology of several diseases. Considering the importance of MicroRNAs in regulating gene expression and in the pathophysiology of several diseases, this study aimed to evaluate the role of microRNAs mir-15a, mir-210, mir-144, and mir-223 in modulating the severity and prognosis of sickle cell anemia patients. Fifty individuals were included in this study, of which 25 normal individuals without the pathology, donors of the blood bank of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre (HCPA), and 25 homozygous SS patients, undergoing medical follow-up at the Reference Center for Sickle Cell Disease of the HCPA. The data were obtained by real-time polymerase chain reaction, with the selection of four candidate microRNAs selected according to the prediction of their target functions already available in the literature, in addition to consulting the medical records and calculating the severity scores. The differences in the expression profiles of each microRNA were compared with the mean of the control group, its association with clinicopathological parameters, correlations between hematological and biochemical variables to assess the influence between the variables, in addition to the diagnostic value of these microRNAs for the severity of the disease, through the ROC curve. The correlation tests revealed 4 laboratory variables statistically significant for the phenotypic profile and the consequent severity of the disease: reticulocytes ( $p = 0.038$ ), LDH ( $p = 0.015$ ), total Hb ( $p = 0.019$ ) and HbF ( $p = 0.043$ ). According to relative quantitative analysis by real-time PCR, the analysis revealed 3 microRNAs differentially expressed. A significant decrease in the expression of mir-15a was observed, showing suppression concerning the controls ( $p < 0.001$ ), while mir-210 and mir-223 revealed to be overexpressed ( $p < 0.001$  and  $p = 0.001$ ). We also found a significant negative correlation of mir-15a of  $-0.523$  ( $p = 0.007$ ), and a significant positive correlation of mir-223 of  $0.563$  ( $p = 0.003$ ) with severity scores. The analysis of the ROC curve revealed mir-15a with a good diagnostic value for severe scores with an area under the curve (AUC) of  $0.809$ , 95% CI, sensitivity and specificity were 75% and 88% at the best cutoff point ( $p = 0.014$ ). Mir-223 also

showed an excellent predictive value for disease severity with an area under the curve (AUC) of 0.831, 95% CI, and sensitivity and specificity of 75% and 94% (p 0.009).

## INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) are single-stranded RNA molecules, which do not encode proteins, from 18 to 25 nucleotides, identified as potential regulators of gene expression, involved in the process of cell proliferation, development, and immunity (1).

Even knowing the molecular basis of the pathophysiology of SCA, the causes and mechanisms that lead to phenotypic heterogeneity remain unknown. Phenotypes seem to be modulated by a multifactorial universe, and evidence indicates that genes, signaling pathways, and protein production have direct interference from epigenetic modulators, and among these modulators, the important role of these small non-coding RNA molecules stands out over up to 70% of the human genome genes (2).

Different profiles of expression of microRNAs in mature erythrocyte and sickle cell reticulocytes versus the normal reticulocytes were evidenced; it is hypothesized that important differences in expression of micrnas may influence the clinical severity of the disease (3). The possibility of predicting phenotypes related to the severity of sickle cell anemia depends on putative biomarkers that can characterize it in a reproducible way.

In this context, microRNAs enter as potential determinants, modifiers, and markers of disease severity. Thus, the analysis of a distinct pattern of expression of these small regulators offers opportunities to understand the mechanism in the pathophysiology of the disease, allowing a greater elucidation of clinical aspects involved in the phenotypic heterogeneity and severity of the disease.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples

This study included samples from 50 individuals, including 25 healthy donors obtained from normal adult individuals (HbAA), blood bank donors from the Hospital de Clínicas de



Porto Alegre (HCPA), and 25 from homozygous patients for hemoglobin S genotype, under regular medical follow-up at the HCPA Sickle Cell Anemia Reference Center. 2.5 mL of peripheral blood was collected in PAXgene ® tubes (Qiagen / BD) containing a lysate that stabilizes intracellular RNA to preserve the expression profile of each gene and subsequently stored at -20 ° C. Exclusion criteria were all individuals presenting Hb variant other than Hb S, and who have received transfusion in the last 3 months.

## Ethics

The HCPA Research Ethics Committee approved the study under number 140075, and an informed written consent was signed by each patient, control, or their parents.

## Data collection

The instrument for collecting data from biochemical, hematological, and clinical manifestations data was performed through medical records and examinations obtained from the hospital services, where hematimetric indices and biochemical data were quantified according to the patient's follow-up routine.

## Severity Score Assessment

A tool developed by a cooperation study in sickle cell disease (CSSCD) was used to calculate the severity of sickle cell disease, including 3,380 patients, using 25 laboratory and clinical variables through Bayesian modeling to estimate the severity of sickle cell disease.

The tool available in <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects> allows the calculation of severity scores and the classification into categories by phenotype, mild, moderate, and severe a score ranging from 0 (less severe) to 1 (more severe) by calculating the risk of death in 5 years. The tool's accuracy was validated in an unrelated set of patients, showing high predictive value due to its high sensitivity and specificity.

## Selection of candidates for miRNAs

MiRNAs candidates were selected according to the predictions of their target functions, already available in the literature, and probable correlation with clinical disease:

hsa-mir-15a: related to fetal hemoglobin levels;

hsa-mir-210: related to the hypoxic environment;

hsa-mir-223: related to inflammatory states;

hsa-mir-144: related to oxidative stress and severity of SCA.

#### Total RNA extraction

Total RNA was isolated using a specific kit for the chosen collection tubes, PAXgene Blood MicroRNA Kit® (Qiagen/BD), following the manufacturer's recommendations, consisting of silica-based purification and RNA stabilization with Spin columns. Subsequently, the concentration and purity of the RNA were determined by measuring absorbance at 260 nm and 280 nm in the Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). To ensure the RNA quality of the samples, a ratio of 260/280 absorbance of approximately two or more was accepted. Then, all samples were standardized in their final volume of total RNA at 3 ng/μl.

#### Complementary DNA Synthesis

For cDNA synthesis, the samples were transcribed using the Reverse Transcription Kit TaqMan® MicroRNA and Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems®), according to the manufacturer's guidelines. Complementary DNA was synthesized from a mature miRNA molecule by reverse transcriptase enzymes and DNA polymerase through specific oligonucleotides for miRNAs of interest. Subsequently, the amplification and detection of miRNAs were performed by qPCR.

#### Statistical Analysis

Initially, normal data distribution was verified by the Shapiro-Wilk test. The differences in quantitative data were analyzed using the Student's t-test, where the differences in the expression profiles of each candidate for miRNA were compared with the mean of the control group. These values were measured with mean  $\pm$  standard deviation.

Spearman's rank correlation was used to analyze the correlation of miRNA levels with severity scores and disease modulators. Univariate and multivariate logistic regression analyses were performed to analyze the predictive value of the miRNA level for severity. The Receiver Operating Characteristic curve (ROC) was used to assess the diagnostic and prognostic value for severity. For this purpose, SPSS software version 20.0 (SPSS, Chicago, IL) was used. The significance level was set at  $p < 0.05$  and 95% power.

## RESULTS

This study included 50 samples, 25 from donors with sickle cell anemia, from both sexes, from the Sickle Cell Anemia Reference Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and 25 from healthy donors. The laboratory profiles of the patients included in the study are shown in Table 1.

	N	Mínimum	Maximum	Mean	Standard deviation
Age	25	7	63	37,28	15,894
TGO U/L	25	25	98	42,92	18,719
TGP U/L	25	12	100	28,20	20,962
BILIRUBIN mg/dl	25	0,60	5,30	2,2440	1,44167
UREA mg/dl	25	11,00	59,00	27,3600	11,37571
CREATININE BLOOD mg/dl	25	0,30	1,20	,5248	0,18998
HB g/dl	25	6,50	11,20	8,6840	1,27857
HBF %	25	2,20	36,40	16,2160	10,26132
LDH U/L	25	378	1892	832,52	390,582
VCM fl	25	78,20	126,80	98,6920	12,43989
PLATELETS $10^3/uL$	25	198	1282	387,84	215,720
RETICULOCYTES %	25	3,23	30,88	11,3288	6,44729
LEUKOCYTES $10^3/uL$	25	4,41	17,59	8,8600	3,61353
Total	25				

Table 1: Characteristics of patients (HbSS) included in the study. Data values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. TGO = glutamic-oxaloacetic transaminase; TGP = glutamic-pyruvic transaminase; Hb = hemoglobin; Hb F= fetal hemoglobin; LDH = lactate dehydrogenase; VCM = Mean corpuscular volume

## CORRELATION OF LABORATORY PARAMETERS AND SEVERITY SCORES

The average severity score of our population was 0.310 (mild), and the proportion of severity was 72.7%, 15.9%, and 11.4% for the mild, intermediate, and severe phenotype, respectively. We sought to identify the influence of these parameters and their correlation with microRNAs and the severity found in this population from the laboratory profile. Spearman's rank correlation was used for nonparametric data and Pearson's correlation for data with normal distribution to analyze the influence of laboratory parameters on severity scores. The correlation tests revealed 4 laboratory variables statistically significant for the severity of the disease and the phenotypic profile. In our study, reticulocytes ( $p = 0.038$ ), LDH ( $p = 0.015$ ), total Hb ( $p = 0.019$ ) and HbF ( $p = 0.043$ ) were found to have an influence on the severity of the disease. The greater the severity of the disease, the greater the number of reticulocytes and LDH levels, and the lower the total and fetal hemoglobin (figure 1).

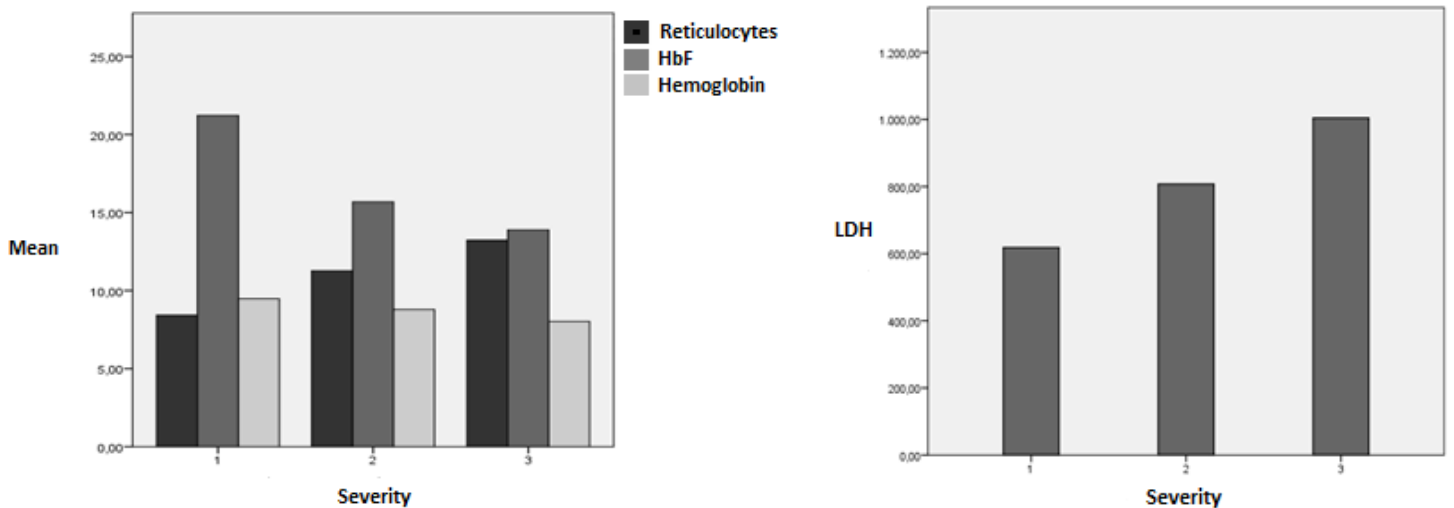


Figure 1: Influence of laboratory parameters on the severity of Sickle Cell Anemia. Severity Rating: 1-mild; 2-Intermediate; 3-Severe

## MICRORNA EXPRESSION

We analyzed the expression levels of the 4 microRNAs in samples from patients with sickle cell anemia versus samples from individuals without the pathology. Student's T-test was used for comparisons between the two independent groups. According to relative quantitative analysis by real-time PCR, the expression of mir-15a was suppressed in relation to the controls ( $p < 0.001$ ), while mir-210 and mir-223 revealed to be overexpressed ( $p < 0.001$  and  $p = 0.001$ ). Mir-144 did not show any statistically significant difference in expression concerning controls ( $p = 0.343$ ). This study suggests that increased or decreased levels of these microRNAs may outline a profile of modifying determinants and correlates of disease severity.

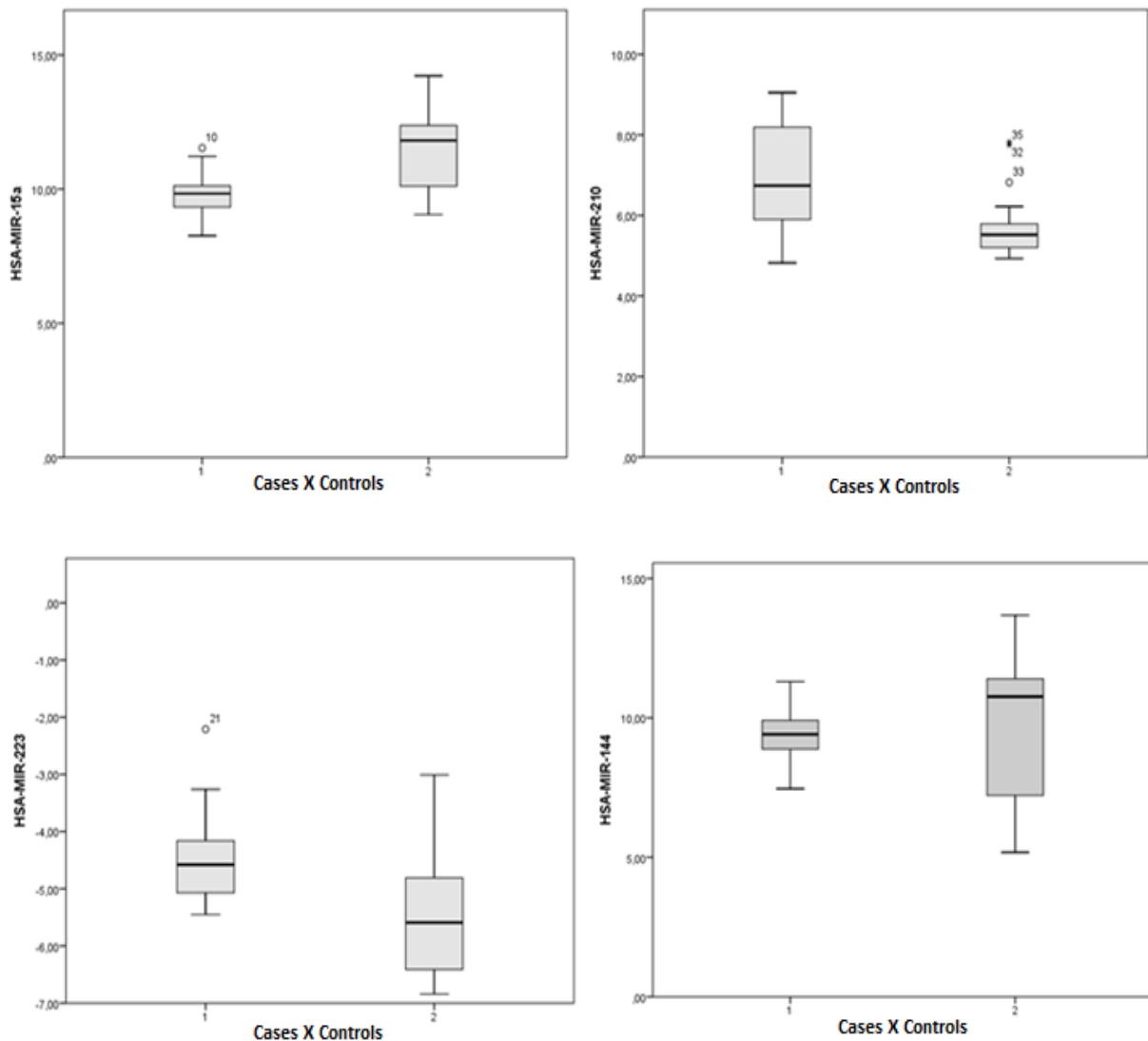


Figure 2: Relative expression of mir-15a (a), mir-210 (b), mir-144 (c) and mir-223 (d) microRNAs in patients with sickle cell anemia (1) and healthy samples (2) after normalization with endogenous control RNU 48. Quantitative data are shown as mean of 2 independent samples, duplicate.

### CORRELATION OF THE EXPRESSION OF MICRORNAS AND SEVERITY SCORES

Pearson's correlation was used to explore the association of severity scores with the expression of each microRNA. We found a significant negative correlation of mir-15a of -0.523 ( $p=0.007$ ), indicating the lower the levels of this microRNA, the greater the severity of the phenotypic profile of these individuals and a significant positive correlation of mir-223 of 0.563 ( $p=0.003$ ) concerning the severity of the disease, where the higher the hsa-mir-223 levels, the greater the severity of the disease.

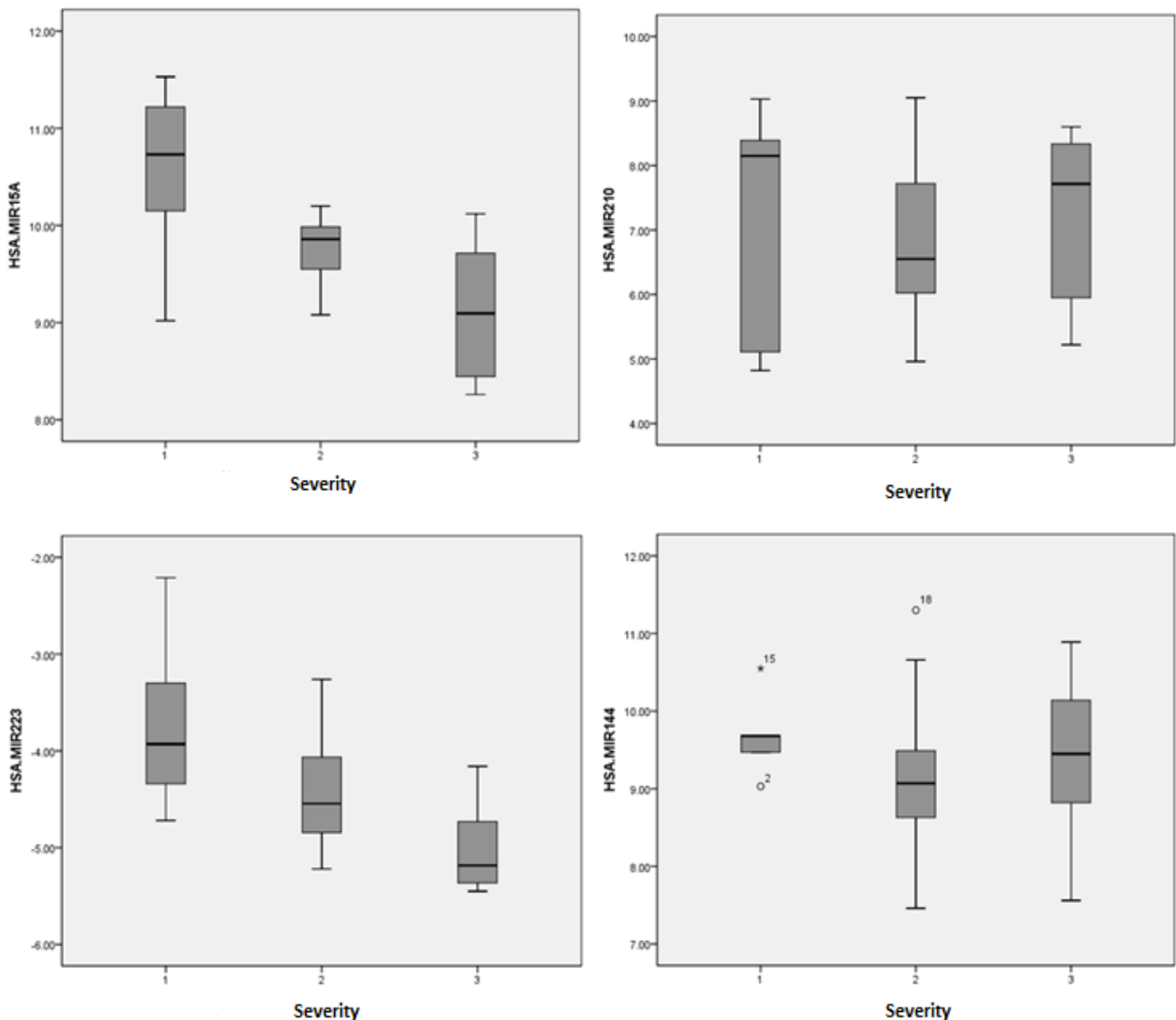
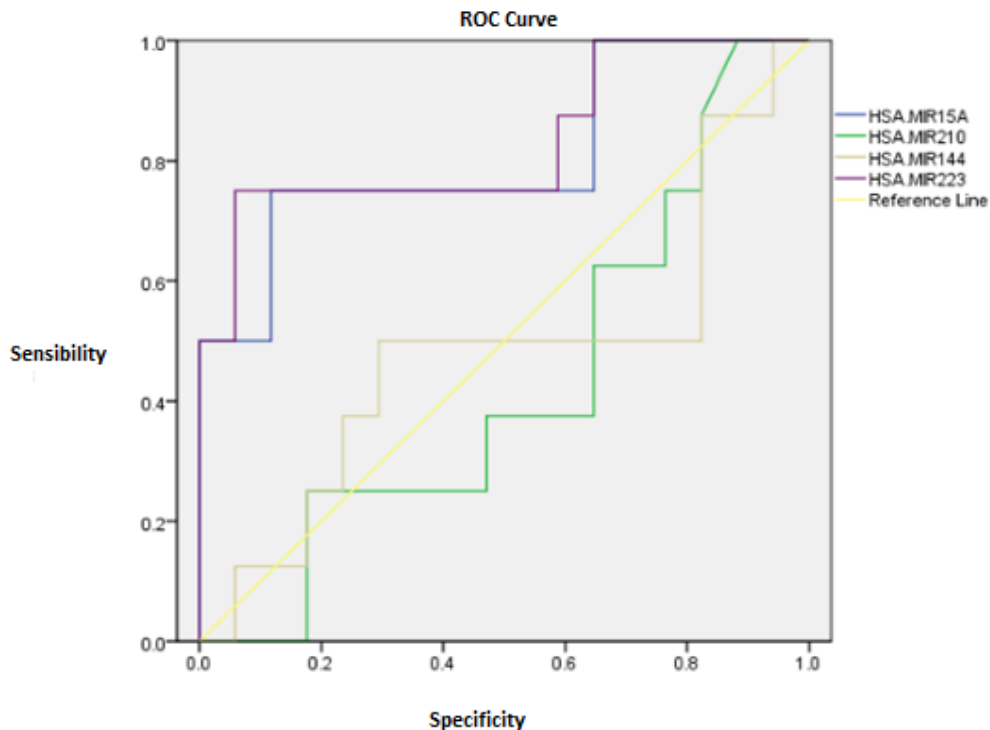


Figure 3: Differential expression of hsa-mir-15a, hsa-mir-210, hsa-mir-223 and hsa-mir-144 microRNAs between severity scores. Pearson's correlation statistical test. hsa-mir-15a with a pearson correlation of  $-0.523$  ( $p=0.007$ ) and hsa-mir-223 with a pearson correlation of  $0.563$  ( $p=0.003$ ).

### DIAGNOSTIC VALUE OF MICRORNAS FOR DISEASE SEVERITY

To evaluate the diagnostic and predictive value of the 4 microRNAs in the severity of the disease, the ROC curve (Receiver Operating Characteristic) was used. The mir-15a revealed to have a good diagnostic value for severe scores with the area under the curve (AUC) of 0.809, 95% CI. Sensitivity and specificity were 75% and 88% at the best cutoff point ( $p$  0.014). Mir-223 also revealed an excellent predictive value for disease severity with the area under the curve (AUC) of 0.831, 95% CI, and sensitivity and specificity of 75% and 94% ( $p$  0.009), respectively. Thus, the ROC curve showed that microRNAs are possible efficient predictors for prediction and potential clinical utility in phenotypic heterogeneity and clinical severity of the disease.



Graphic 1. Evaluate the diagnostic and predictive value of the 4 microRNAs in the severity of the disease.

### ASSOCIATION OF MICRORNAS WITH CLINICOPATHOLOGICAL PARAMETERS

In the perspective of defining potential putative biomarkers of clinical events of sickle cell anemia, the association of microRNAs with clinicopathological parameters was studied. For this analysis, the statistical T-test was used with each microRNA's mean and standard deviation concerning the occurrence or not of the clinical manifestation, according to Table 2.

Only for pulmonary hypertension, a significant association of hsa-mir-223 (0.002) was obtained. It was not possible to statistically determine the influence of these small regulators on other clinical manifestations in individuals with Hb SS. We hypothesize that the number of cases has limited the evidence of association. However, there was a tendency for hsa-mir-144 to have an influence on the manifestation of bone necrosis (0,087) and cardiomegaly (0.080), hsa-mir-210 for leg ulcers (0.080), hsa-mir-15a for sepsis (0.072), and e cardiomegaly (0.059).

Clinical manifestations	N° cases (n=25)	Expression hsa- mir-15a (mean)	Expression hsa- mir-210 (mean)	Expression hsa- mir-144 (mean)	Expression hsa-mir-223 (mean)
<b>STROKE</b>					
Yes	7 (28%)	9,47	6,53	9,17	4,47
No	18 (72%)	9,80	7,19	9,42	4,44
p-value	-	0,365	0,288	0,555	0,936
<b>BONE NECROSIS</b>					
Yes	4 (16%)	9,44	6,83	10,10	4,33
No	21 (84%)	9,76	7,04	9,21	4,47
p-value	-	0,475	0,791	<b>0,087</b>	0,752
<b>TRANSFUSION</b>					
Yes	6 (24%)	10,04	6,32	8,91	4,00
No	19 (76%)	9,61	7,22	9,49	4,50
p-value	-	0,253	0,167	0,205	0,205



---

**LEG ULCERS**

Yes	4 (16%)	10,11	8,12	9,51	4,76
No	21 (84%)	9,63	6,80	9,32	4,39
p-value	-	0,280	<b>0,080</b>	0,733	0,417

**PAIN CRISES**

Yes	19 (76%)	9,74	7,09	9,45	4,52
No	6 (24%)	9,60	6,74	9,04	4,23
p-value	-	0,710	0,602	0,377	0,606

**SEPSIS**

Yes	5 (20%)	9,14	6,99	9,14	4,90
No	20 (80%)	9,85	7,01	9,40	4,34
p-value	-	<b>0,072</b>	0,975	0,587	0,167

**ACS**

Yes	2 (8%)	9,86	6,99	8,63	4,55
No	23 (92%)	9,70	7,02	9,41	4,44
p-value	-	0,788	0,982	0,272	0,865

**PULMONARY  
HYPERTENSION**

Yes	1 (4%)	10,73	8,39	9,69	2,21
No	24 (96%)	9,67	6,95	9,34	4,54
p-value	-	0,200	0,320	0,730	<b>0,002</b>

**INFECTIONS**

Yes	9 (36%)	9,73	6,55	9,14	4,54
No	16 (64%)	9,70	7,27	9,47	4,40
p-value	-	0,940	0,220	0,408	0,68

---

<b>CHOLELITHIASIS</b>					
Yes	6 (24%)	9,86	7,78	9,48	3,99
No	19 (76%)	9,66	6,76	9,31	4,60
p-value	-	0,612	0,120	0,724	0,107
<b>HEPATOSPLENOMEGALY</b>					
Yes	1 (4%)	8,51	8,01	8,76	5,29
No	24 (96%)	9,76	6,97	9,38	4,41
p-value	-	0,125	0,474	0,536	0,297
<b>SEIZURES</b>					
Yes					
No	2 (8%)	9,58	7,17	9,43	4,46
p-value	23 (92%)	9,72	6,99	9,34	4,45
	-	0,808	0,870	0,912	0,985
<b>CARDIOMEGALY</b>					
Yes	2 (8%)	10,73	7,72	10,49	4,97
No	23 (92%)	9,62	6,95	9,25	4,40
p-value	-	<b>0,059</b>	0,463	<b>0,080</b>	0,353

## DISCUSSION

Determining the severity of sickle cell anemia has been a challenge. Variables such  $\alpha$  thalassemia, HbF, laboratory indices, and age have been discussed extensively and are estimated as biomarkers of severity (4). However, in recent years there have been advances in research involving non-coding RNAs as genetic modifiers of various diseases. The role of microRNAs in various hematological disorders has been explored and presented as essential for several cellular processes and can regulate a range of target genes (5). The post-transcriptional regulation of HbF by microRNAs has been studied and correlated with increased or decreased expression; such mechanisms have been studied as the main factor for severity and consequent phenotypic heterogeneity in SCA (6).

The patterns of expression of microRNAs in the whole blood seem to be influenced essentially by erythrocytes, and these deposits of these regulators are in the circulatory system. Evidence suggests that the main mechanism would be mediated by microvesicles that would transport them to receptor cells through the circulatory system. Thus, the transfer of microRNAs mediated by microvesicles would be an effective form of signal transduction, modulating cellular processes in the receptor cells (7). Thus, since the discovery of the importance of microRNAs in the transcription and regulation of several genes, studies have explored the relationships of the expression profile of microRNAs in mature erythrocytes and reticulocytes of homozygous patients for sickle cell mutation (Hb SS) and normal individuals without the pathology. When compared, although erythrocytes do not present a nucleus, an expression of 83 specific microRNAs was verified, with a particular microRNAs profile, which differentiates them from normal individuals. (8,9).

We analyzed the expression of 4 microRNAs according to the predictions of their target functions and probable correlation with the disease clinic. Three were statistically and differentially expressed among individuals with SCA and healthy control individuals. We found suppression of mir-15a and overexpression of mir-210 and mir-223. However, we did not identify a statistically significant difference in the expression of mir-144 concerning controls. We also identified substantial correlations with the clinical course of the disease and severity of the phenotypic profile and to obtain a detailed understanding of the role of these regulators, we speculated the diagnostic value for clinical practice.

One of the microRNAs revealed as specific in SCA is hsa-mir-144. This microRNA is positively regulated in these patients, where its overexpression has been correlated with more severe anemia (10). Previous studies reveal that hsa-mir-144 would be directly related to a central regulator of the oxidative stress response, the erythroid nuclear factor 2 (NF-E2/Nrf2) and that the increase in hsa-mir-144 would lead to a decrease in NRF2 levels, providing a reduced response to oxidative stress with a consequent increase in severity (10). In another study Li B. (2018) demonstrated that in addition to silencing the Nrf2 gene, mir-144 leads to concomitant repression of  $\gamma$ -globin transcription, inhibiting the expression of fetal hemoglobin in SCA (11). Sun *et al.* (2018) showed that mir-144 derived from erythrocytes is affected by hypoxic environments, being an essential regulator in the production and function of this microRNA (12). Our study found no significant difference in expression in relation to controls nor correlation with severity scores. These results are perhaps obtained by the use of

HU(Hydroxyurea) of the analyzed patients because HU causes a differential expression in a set of microRNAs associated with  $\gamma$ -globin (13).

In previous studies, hsa-mir-15a was correlated with the regulation of fetal hemoglobin expression, playing an essential role in silencing fetal hemoglobin genes when overexpressed (14). Since MYB 3'-UTR is a direct target of hsa-mir-15a, MYB protein levels are reduced with a small increase in this microRNA, leading to an increase in  $\gamma$ -globin expression. In our population, we identified suppression of hsa-mir-15a in individuals with SCA, which would result in an increase in Myb expression with consequent decrease of  $\gamma$ -globin and decrease in HbF. In addition, we also found a significant negative correlation with severity scores, validating our hypothesis that the lower the hsa-mir-15a levels, the greater the severity of the phenotypic profile.

Chronic anemia is one of the most significant variants in the development of a hypoxic environment, leads to the increase of hypoxia-dependent microRNAs. HypoximiR 210 plays a direct role over regulatory factors such as GATA1, Kruppel factor (EKLF), and ALAS2, besides being responsible for affecting transferrin (CD71) and glycophorin (GPA, CD235a) receptors, increasing levels of  $\alpha$  and  $\gamma$  globin with a consequent increase in HbF (3,15). The involvement of hsa-mir-210 in the positive regulation of the  $\gamma$ -globin gene was also demonstrated by Gasparello et al. (2017), in which they showed that the suppression of hsa-mir-210 leads to a reduction in the globin gene and consequently low HbF (16). In another previous study, Sarakul *et al.* (2013), showed that hsa-mir-210 is positively regulated in cells cultivated under hypoxia conditions (15). Such studies support our findings, where hypoxamiR 210 was overexpressed when compared to controls, corroborating our hypothesis that under hypoxic conditions, this microRNA suffers an increase in its expression, mediating the adaptation and cellular response in hypoxia conditions. Although the target genes and mechanism are not yet well known, the influence of this small regulator on erythropoiesis seems evident.

Another microRNA with an emerging role as a new target biomarker for inflammatory diseases is hsa-mir-223. Identified as a potential regulator of the immune response of disorders involving inflammation and hematopoiesis, this small regulator has its expression specifically in the myeloid lineage, influencing the development and hematopoietic differentiation (17). Mir-223 is highly expressed and regulated in hematopoietic cells, playing a key role in myeloid cells. Its role in the differentiation and especially in the activation of macrophages and

neutrophils has direct consequences in inflammatory disease (18). When we analyzed the association with clinical-pathological parameters, we found trends and a significant association of hsa-mir-223 as a potential biomarker for clinical events. It was possible to identify a significant increase in hsa-mir-223 in relation to controls by investigating expression patterns.

A receiver operating characteristic (ROC) curve was generated to evaluate the diagnostic accuracy of these microRNAs. Its AUC was 0.809 ( $p=0.014$ , 95% CI) for mir 15a, while for mir-223 the area under the curve (AUC) was 0.831, ( $p=0.009$ ; 95% CI), inferring that hsa-mir-15a and hsa-mir-223 present high potential and precision for clinical utility in the severity of the disease.

We performed a correlation analysis of laboratory parameters with the severity score to explore a potential association of these markers with the clinical course of the disease. The associations found in our study are evident between laboratory parameters (reticulocytes, LDH, total Hb, and HbF) and clinical severity. Studies had already evidenced the importance of these parameters in the differential diagnosis, with an essential difference in the compensatory proliferative activity of the medulla in relation to increased hemolysis (19). Carden et al. (2020) show that the number of reticulocytes can predict severity in patients with SCA due to its morphological and adhering characteristics (20). Lactate dehydrogenase, in turn, has been addressed as a diagnostic and prognostic factor for acute and chronic complications as a marker of intravascular hemolysis (21–23). Studies have also shown that the mean concentration of HbT and HbF predicts the higher incidence of clinical manifestations (24). In addition, genomic analysis of microRNAs expression in sickle cell diseases has been the target of several studies in recent years (8). Understanding the processes mediated by these small regulators through post-transcriptional mechanisms gives us opportunities to study the regulation of their targets and the understanding of the mechanism of these small regulators in cellular processes and evaluate their impact and biological significance in the severity of the disease.

In summary, our results show several important clinical applications for pathophysiology and clinical heterogeneity of the disease. Initially, our results point to the role of microRNAs in the regulation of epigenetic machinery of sickle cells and may provide promising information for the development of efficient strategies in the pathophysiology of the disease. Our data also show that microRNAs may present as potential biomarkers with high diagnostic and predictive value in the severity of the disease. And finally, the possibility of

predicting phenotypes related to the severity of sickle cell disease with these putative biomarkers characterizing it in a reproducible way.

## CONCLUSION

Identifying the involvement of potential regulators in the pathophysiology of the disease makes microRNAs promising for future therapeutic approaches in Sickle Cell Anemia. The normalization of this differential expression through therapies has been the subject of several studies. However, a greater understanding of the range of action of these small regulators deserves attention since a single miRNA can regulate hundreds of genes simultaneously. Our results suggest that the distinct pattern of expression found among individuals with SCA and individuals without the pathology may allow the discovery of therapies against specific pathophysiological targets and a greater elucidation of clinical aspects involved in the evolution of the disease, besides allowing an assessment of phenotypic severity and heterogeneity.

## DECLARATION OF CONFLICTS OF INTERESTS

The author (s) have declared no potential conflict of interest concerning the research, authorship and/or publication of this article.

## REFERENCES

1. DP B. MicroRNAs : Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function.pdf. Cell [Internet]. 2004;116(2):281–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438>.
2. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet.* 2005;37(7):766–70.
3. Saki N, Abroun S, Soleimani M, Kavianpour M, Shahjahani M, Mohammadi-Asl J, et al. MicroRNA expression in  $\beta$ -Thalassemia and sickle cell disease: A role in the induction of fetal hemoglobin. *Cell J.* 2016;17(4):583–92.
4. Habara A, Steinberg MH. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. *Exp Biol Med.* 2016;241(7):689–96.

5. Barron N. *MicroRNAs as Tools in Biopharmaceutical Production*. 1st ed. Glasnevin, Dublin; 2012. 124 p.
6. Light DR. Can natural variation in erythroid microRNA-29b be translated to sickle cell disease severity? *Br J Haematol*. 2019;186(1):11–2.
7. Sippert EA, Visentainer JEL, Alves HV, Rodrigues C, Gilli SCO, Addas-Carvalho M, et al. Red blood cell alloimmunization in patients with sickle cell disease: correlation with HLA and cytokine gene polymorphisms. *Transfusion*. 2017;57(2):379–89.
8. Chen SY, Wang Y, Telen MJ, Chi JT. The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases. *PLoS One*. 2008;3(6).
9. Byon JCH, Papayannopoulou T. MicroRNAs: Allies or Foes in erythropoiesis? *J Cell Physiol*. 2012;227(1):7–13.
10. Sangokoya C, Telen MJ, Ch J-T. MicroRNA miR-144 modula a tolerância ao estresse oxidativo e associa-se à gravidade da anemia na doença falciforme. *Blood J*. 2019;1–62.
11. Li B, Zhu X, Ward CM, Starlard-davenport A, Takezaki M. MIR-144-mediated NRF2 gene silencing inhibits fetal hemoglobin expression in sickle cell disease. *Exp Hematol*. 2019;85–96.
12. Nallamshetty S, Chan SY, Loscalzo J. Hypoxia: A master regulator of microRNA biogenesis and activity. *Free Radic Biol Med*. 2013;64:20–30.
13. Pule GD, Mowla S, Novitzky N, Wonkam A. Hydroxyurea down-regulates BCL11A, KLF-1 and MYB through miRNA-mediated actions to induce  $\gamma$ -globin expression: implications for new therapeutic approaches of sickle cell disease. *Clin Transl Med*. 2016;5(1).
14. Sankaran VG, Menne TF, Scepanovic D, Vergilio J-A, Ji P, Kim J, et al. MicroRNA-15a and -16-1 act via MYB to elevate fetal hemoglobin expression in human trisomy 13. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(4):1519–24.
15. Sarakul O, Vattanaviboon P, Tanaka Y, Fucharoen S, Abe Y, Svasti S, et al. Enhanced erythroid cell differentiation in hypoxic condition is in part contributed by miR-210. *Blood Cells, Mol Dis* [Internet]. 2013;51(2):98–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2013.03.005>.
16. Gasparello J, Fabbri E, Bianchi N, Breveglieri G, Zuccato C, Borgatti M, et al. BCL11A mRNA targeting by miR-210: A possible network regulating  $\gamma$ -globin gene expression. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12).
17. Aziz F. The emerging role of miR-223 as novel potential diagnostic and therapeutic target for inflammatory disorders. *Cell Immunol* [Internet]. 2016;303(April):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.04.003>.
18. Yuan X, Berg N, Lee JW, Le TT, Neudecker V, Jing N, et al. MicroRNA miR-223 as regulator of innate immunity. *J Leukoc Biol*. 2018;104(3):515–24.

19. Cortellazzi LC, Teixeira SM, Borba R, Gervásio S, Cintra CS, Grotto HZW. Reticulocyte parameters in hemoglobinopathies and iron deficiency anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2003;25(2):97–102.
20. Carden MA, Fasano RM, Meier ER. Not all red cells sickle the same: Contributions of the reticulocyte to disease pathology in sickle cell anemia. *Blood Rev* [Internet]. 2020;40:100637. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.100637>.
21. Stankovic Stojanovic K, Lionnet F. Lactate dehydrogenase in sickle cell disease. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2016;458:99–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2016.04.035>.
22. Kato GJ, McGowan V, Machado RF, Little JA, Taylor VI J, Morris CR, et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood.* 2006;107(6):2279–85.
23. Susa S, Daimon M, Ono H, Li S, Yoshida T, Kato T. Lactate dehydrogenase isoenzyme 3 and hemolysis in sickle cell anemia: a possible correlation? *Blood J.* 2002;100(13):4679–80.
24. Ataga KI, Gordeuk VR, Agodoa I, Colby JA, Gittings K, Allen IE. Low hemoglobin increases risk for cerebrovascular disease, kidney disease, pulmonary vasculopathy, and mortality in sickle cell disease: A systematic literature review and meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(4):1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0229959>.



ORIGINAL PAPER 3

**INFLAMMATORY MEDIATORS ARE ASSOCIATED WITH CLINICAL COURSE  
AND PHENOTYPIC DIVERSITY IN SICKLE CELL ANEMIA**

Ianaê Indiará Wilke <sup>1,2</sup>, Daniela Richter<sup>2</sup>, Annelise Pezzi <sup>1,2</sup>, Vanessa Valim <sup>2</sup>, Maria Aparecida da Silva <sup>2</sup>, Bruna Amorim <sup>2</sup>, Filipe Sehn <sup>1,2</sup> Raul Marques Rodrigues <sup>3</sup>, Nicole Kilian<sup>3</sup>, Lúcia Silla <sup>4</sup>.

1. Post-graduation in Medicine: Medical Sciences - Federal University of Rio Grande do Sul.
2. Laboratory of Cell Culture and Molecular Analysis of Hematopoietic Cells from the Research Center of the Hospital das Clínicas of Porto Alegre
3. Graduation student of the Laboratory of Cell Culture and Molecular Analysis of Hematopoietic Cells of the Research Center of the Hospital of Clinics of Porto Alegre
4. PhD. Professor, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, head of the Laboratory of Cell Culture and Molecular Analysis of Hematopoietic Cells of the Research Center of the Hospital das Clínicas of Porto Alegre.

Correspondence:

Professora Dra. Lucia Silla, MD, PhD

Laboratório de Cultura Celular e Análise Molecular de Células Hematopoiéticas

Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcellos, 2350

CEP: 90035-903- Porto Alegre/RS, Brasil

Phone number: +55 (51) 3359-8317

E-mail: lsilla@hcpa.ufrgs.br

## ABSTRACT

Inflammation plays a key role in the pathophysiology of Sickle Cell Anemia. A possible clinical impact of cytokines on the clinical course of SCA has prompted the search for an understanding of the possible modulating role of these proteins in the phenotypic variability of SCA. Despite being classified as a monogenic disease, in which patients have the same genetic mutation, there is great phenotypic heterogeneity with consequent variation in severity. The SCA clinical heterogeneity seems to be associated with modulators not yet known in a multifactorial environment, including the expression of inflammatory molecules that appear to be associated with the clinical course of the disease and the consequent incidence. Thus, we evaluated the role of these modulators in the clinical course of the disease and their association with phenotypic variability in patients with SCA followed up at the disease reference center at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Cytokines, chemokines, and growth factors were evaluated in 40 serum samples from individuals with HbSS and 33 controls with normal hemoglobin HbAA through the Luminex platform, where 30 analytes were measured simultaneously (EGF; HGF; VEGF; MIG; RANTES; Eotaxin; IL -8; GM-CSF; TNF alpha; IL-1 beta; IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-10; MIP-1 alpha; IL-17; MIP-1 beta; IP -10; IFN alpha; IL-7; IL-15; MCP-1; G-CSF; IL-2R; IFN gamma; FGF-Basic; IL-1RA; IL-12 and IL-13) and compared with the control group (HbAA). To test the hypothesis that systemic levels of these molecules could be associated with phenotypic variability of the disease, we investigated the associations with severity scores and clinicopathological aspects. Our results showed higher concentrations of IL1 $\beta$  (p = 0,043), IL10 (p = 0,049), IL6 (p = 0,023), MCP1 (p = 0,041) and HGF (p = 0,008) in patients compared to control. In addition, a lower concentration of IFN $\alpha$  (p = 0,032) was observed in these patients. When we evaluated the importance of these modulators in phenotypic variability, statistically significant differences were found in patients who had a more severe profile than those with a milder clinical profile (p <0,005). In addition, the risk of developing bone necrosis was associated with a lower concentration of IL-10 (p = 0,006), pain crises with a higher concentration of IL-17 (0,041), pancreatitis with a higher concentration of IL-4 ( p = 0,048) and cardiomegaly at a higher concentration of IL-8 (p = 0,047). Thus, our results suggest the association and an important role of these inflammatory modulators in the chain of SCA severity and phenotypic variability, which can be established as biomarkers of risk factors for developing a more severe disease profile.

## INTRODUCTION

Despite being classified as a monogenic disease, Sickle Cell anemia is an illness with a complex pathophysiological mechanism, presenting itself as a chronic inflammatory disease associated with multiple factors such as inflammatory mediators (1,2).

Although inflammatory mediators have been the subject of studies, their role in the phenotypic heterogeneity of the disease is still unclear. The release of cytokines in response to cell activation, hemolysis, inflammatory processes, and recurrent vaso-occlusion seems to play an important role in SCA pathophysiology (3). Experimental evidence has shown cytokine overexpression in stable HbSS patients and during a vaso-occlusive crisis; however, these results are quite controversial, and the associations with severity scores and clinicopathological aspects have been little explored.

In this context, we analyzed cytokines, chemokines, and growth factors. We hypothesize that systemic levels of these molecules are associated with variability in the degree of severity of the disease and the development of clinicopathological aspects.

## MATERIAL AND METHODS

### Samples

A total of 73 individuals were included in the study, evaluated in two groups: 40 patients with SCA (HbSS) and a control group consisting of 33 individuals without the pathology (HbAA). Serum samples were collected at the time of recruitment. Samples from HbAA individuals were collected from persons with no history or clinical evidence of inflammatory diseases or who used any medication that could interfere with the concentration of these inflammatory proteins.

### Ethics

The HCPA Research Ethics Committee approved the study under number 2019-0367, and a written informed consent was signed by each patient, control, or their parents.

### Data collection

The collection instrument for biochemical, hematological data, and clinical manifestations took place through medical records and exams obtained from the hospital services, where the indexes were quantified according to the patient's monitoring routine.

#### LUMINEX Immunoassay

The tests were performed using the Cytokine Human Magnetic 30-Plex panel, according to the manufacturer's guidelines, in which it is specifically designed to quantify human cytokines, chemokines, and growth factors in serum, measuring 30 analytes simultaneously. The testing of the samples occurred at a dilution of 1:3 and was determined in duplicate to verify the intra-assay precision.

#### Severity Score Assessment

To calculate the severity of sickle cell anemia, a tool developed by a cooperation study in sickle cell disease that used 3380 patients (CSSCD) was used, employing 25 laboratory and clinical variables through Bayesian modeling to estimate the severity of sickle cell anemia. The tool available at <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects> makes it possible to calculate severity scores and classify them into categories by phenotype — light, moderate and severe — through a score ranging from 0 (less severe) to 1 (more severe) by calculating the risk of death in 5 years. The tool accuracy was validated in an unrelated set of patients, showing a high predictive value due to its high sensitivity and specificity.

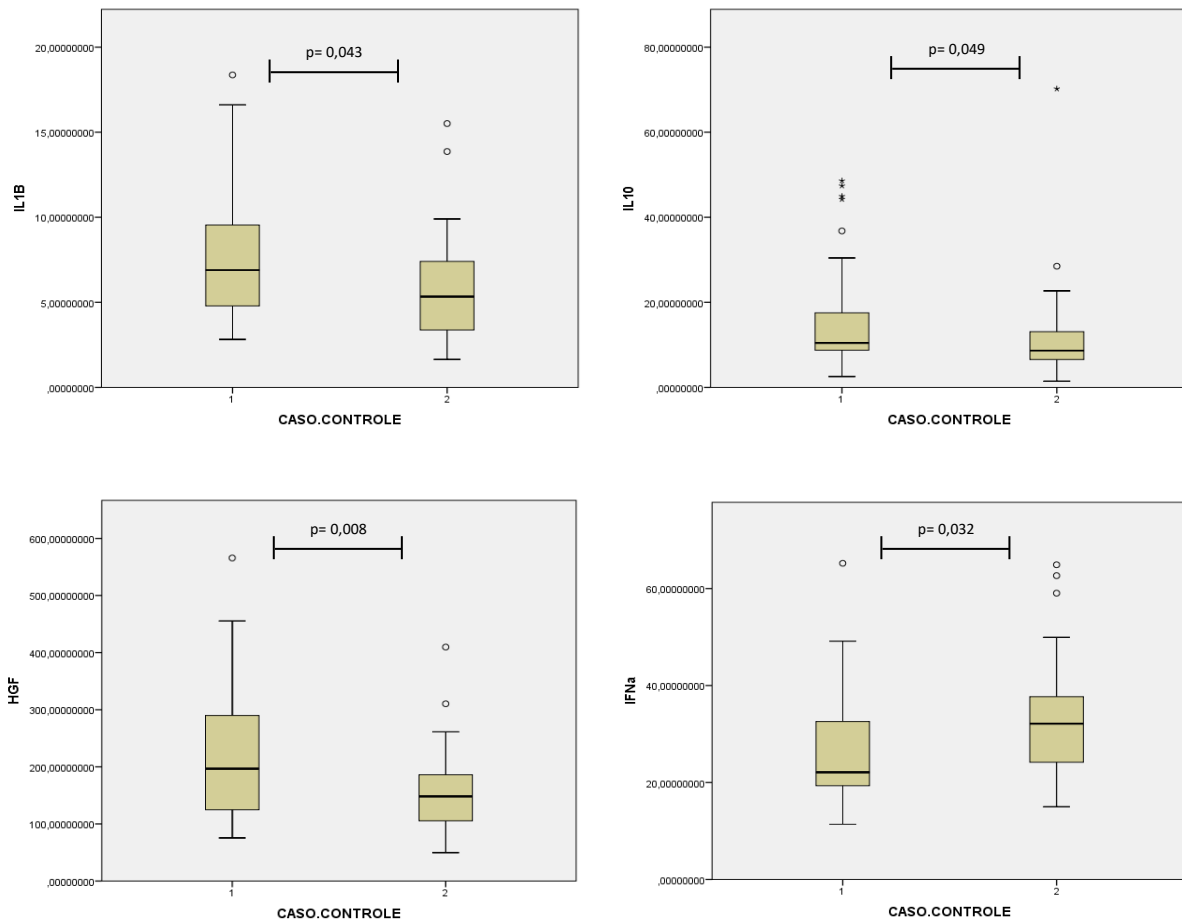
#### Statistical Analysis

Comparisons between variables and groups were made using the Mann-Whitney test for independent samples without normal distribution. For multiple comparisons, Kruskal - Wallis with post hoc was used, with the significance values adjusted by Bonferroni Correction. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation, median, frequency, and percentages. For this purpose, SPSS software version 26.0 (SPSS, Chicago, IL) was used. A significance level of  $p < 0,05$  and a power of 90% was considered.

## RESULTS

Supplementary Table 1 (S1) shows the hematological and biochemical characteristics of the population of the studied HbSS individuals. Patients had an average follow-up of 29,5 years with a median age of 28 years; of these individuals, 68.5% were women. From the HbSS group (n = 40), 1,3% of patients developed stroke, 7,5% bone necrosis, 8,8% leg ulcers, 47,5% pain

crisis, followed by 1,3% sepsis, 3,8 % ACS, 1,3% pulmonary hypertension, 5,0% splenomegaly, 23,8% infections, 1,3% developmental delay, 3,8% pancreatitis, 6,3% cholelithiasis, 1,3% hepatosplenomegaly, 1,3% seizures, and 2,5% cardiomegalies. The average concentrations of 28 of the 30 cytokines, chemokines, and growth factors of the panel are shown in Table 1. The data demonstrated that individuals with HbSS showed an overall increase in most inflammatory markers compared to HbAA individuals. Concentrations of 2 analytes could not be quantified due to the limits of detection of the test (RANTES and GM-CSF). Of the detectable, IL1 $\beta$ , IL-10, IL-6, MCP-1, HGF and IFN $\alpha$  showed statistical differences in relation to the controls ( $p = 0,043$ ;  $p = 0,049$ ;  $p = 0,023$ ;  $p = 0,041$ ;  $p = 0,008$  and  $p = 0,032$  respectively). The analytes IL-12 ( $p = 0,076$ ), IL-7 ( $p = 0,091$ ) and IL-2R ( $p = 0,084$ ) showed an association trend, where the HbSS group showed higher concentrations of IL-12 and IL-2R and decreased IL-7 compared to the control group (HbAA). The levels of the other analytes in the two groups were similar, with no statistical difference.



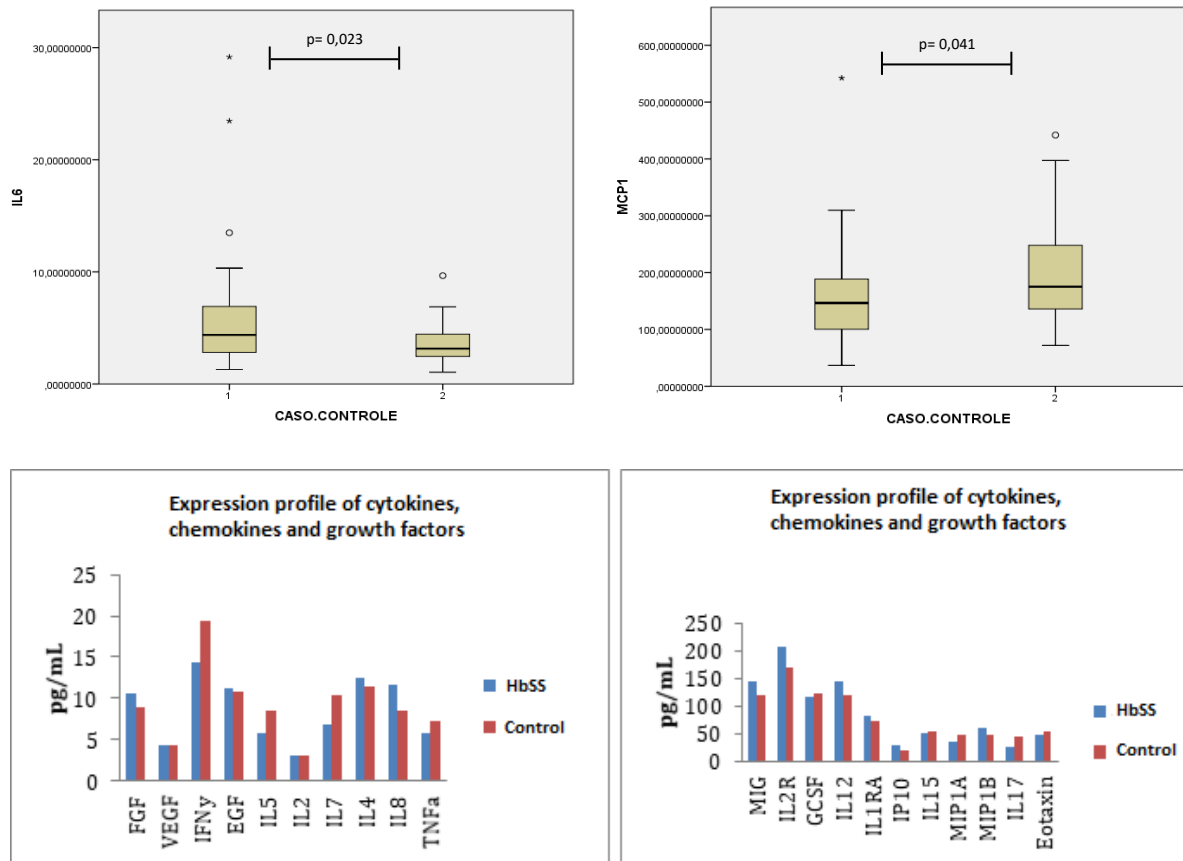


Figure 1. Cytokine concentration in serum of patients with FA at steady state (HbSS) and controls (HbAA). How they were analyzed in duplicate. Mann-Whitney. 1- Cases (HbSS) 2- Controls (HbAA).

Table 1. Values of cytokines, chemokines and growth factors from patients (HbSS) and controls (HbAA)

	HbSS (n=40)	HbAA (n=33)	
Age (median,IQR)	32 (7-68)	27 (18-59)	
Gender (n, % female)	27 (67,5%)	23 (69,7%)	
Cytokines (mean, IQR)			p-value
FGF (pg/mL)	10,71 (3,63-71,06)	9 (4,61-19,16)	0,938
IL-1B (pg/mL)	7,55 (2,82-18,36)	5,90 (1,64-15,50)	0,043*
G-CSF (pg/mL)	115,73 (60,51-256,50)	121,52 (47,09-255,45)	0,807
IL-10 (pg/mL)	15,72 (2,55-48,59)	11,95 (1,45-70,20)	0,049*
IL-13 (pg/mL)	14,36 (3,77-44,87)	18,86 (1,66-54,62)	0,112
IL-6 (pg/mL)	6,03 (1,29-29,16)	3,69 (1,05-9,66)	0,023*
IL-12 (pg/mL)	146,09 (74,91-364,98)	119,94 (79,71-169,16)	0,076
EOTAXIN (pg/mL)	47,05 (10,37-137,04)	53,26 (14,77-156,84)	0,61
IL-17 (pg/mL)	26,78 (0,55-184,10)	45,46 (3,00-356,96)	0,227
MIP-1A (pg/mL)	34,36 (18,75-77,48)	48,57(18,55-453,00)	0,36
MIP-1B (pg/mL)	59,88 (14,15-258,13)	48,90 (13,01-120,76)	0,225
MCP-1 (pg/mL)	161,84 (36,71-542,36)	204,78 (71,96-441,92)	0,041*
IL-15 (pg/mL)	51,77 (14,92-200,92)	54,55 (19,76-141,73)	0,208

EGF (pg/mL)	11,17 (3,04-40,22)	10,80 (4,32-23,58)	0,366
IL-5 (pg/mL)	5,87 (1,74-23,38)	8,48 (0,65-43,39)	0,21
HGF (pg/mL)	220,41 (75,53-565,79)	156,67 (49,73-409,72)	0,008*
VEGF (pg/mL)	4,28 (1,32-11,20)	4,40 (1,77-10,53)	0,561
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	16,95 (6,40-41,65)	19,97 (9,75-45,96)	0,156
IFN- $\alpha$ (pg/mL)	26,75 (11,38-65,20)	32,91 (15,00-64,90)	0,032*
IL-1RA (pg/mL)	82,83 (35,75-248,91)	73,67 (30,80-153,03)	0,686
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	5,75 (1,51-18,94)	7,30 (1,51-24,77)	0,249
IL-2 (pg/mL)	3,14 (1,36-16,34)	3,02 (1,41-7,38)	0,3
IL-7 (pg/mL)	6,88 (1,67-32,01)	10,37 (0,74-37,21)	0,091
IP-10 (pg/mL)	29,35 (5,37-136,37)	19,57 (4,79-69,20)	0,346
IL2-R (pg/mL)	206,67 (86,99-553,48)	171,24 (57,73-515,06)	0,084
MIG (pg/mL)	143,40 (39,59-1050,21)	120,18 (25,94-974,99)	0,249
IL-4 (pg/mL)	12,44 (3,75-127,02)	11,46 (3,48-29,81)	0,335
IL-8 (pg/mL)	11,65 (0,57-180,19)	8,49 (0,69-26,12)	0,492

Note: Kruskal-Wallis (numerical variables with non-normal distribution). FGF (Fibroblast Growth Factor); GCSF (granulocyte colony stimulating factor); MIP (Inflammatory Macrophage Proteins); MCP (monocyte chemoattractant protein); EGF (epidermal growth factor); HGF (hepatocyte growth factor); VEGF (vascular endothelial growth factor); IFN (interferon); IP (protein 10 induced by gamma interferon); MIG (interferon gamma-induced monokine); IL (interleukins); TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha).

When investigating the associations with severity scores and clinicopathological aspects, we found that systemic levels of these molecules are associated with variability in the degree of severity of the disease. Our results showed statistically significant differences in patients with a more severe profile than those with a milder clinical profile (Table 2).

Thus, when analyzing the clinical impact of these mediators on severity, the concentration of these analytes showed a very significant relationship with the severity of the disease compared to a classification between mild, moderate, and severe in these patients. The concentrations of inflammatory mediators revealed that the levels of 20 of them appear to impact the clinical severity of the disease (FGF; IL1 $\beta$ ; GCSF; IL-13; MIP1A; MIP1B; MCP1; IL-15; EGF; IL-5; HGF; VEGF; IFN $\gamma$ ; IFN $\alpha$ ; IL1RA; TNF $\alpha$ ; IL-2; IL-7; IP10; and IL-8 ( $p < 0,05$ ). No significant differences were found for IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL2R, MIG, and IL-4 when comparing milder and more severe disease profiles.

Table 2. Association of inflammatory mediators with degree of disease severity.

Inflammatory mediators	mild/moderate (p)	moderate/severe (p)	Mild/severe (p)
FGF (p= 0,006)	0,291	<b>0,01*</b>	<b>0,027*</b>
IL-1B (p= 0,020)	0,213	1	<b>0,022*</b>
G-CSF (p= 0,004)	1	0,353	<b>0,002*</b>
IL-10 (p= 0,064)	×	×	×
IL-13 (p= 0,003)	1	0,22	<b>0,002*</b>
IL-6 (p= 0,088)	×	×	×
IL-12 (p= 0,391)	×	×	×
EOTAXIN (p= 0,100)	×	×	×
IL-17 (p= 0,528)	×	×	×
MIP-1 <sup>a</sup> (p= 0 ,002)	1	<b>0,035*</b>	<b>0,003*</b>
MIP-1B (p= 0 ,006)	1	0,052	<b>0,007*</b>
MCP-1 (p= 0 ,007)	1	0,431	<b>0,005*</b>
IL-15 (p= 0 ,006)	1	0,063	<b>0,007*</b>
EGF (p= 0 ,004)	1	0,066	<b>0,004*</b>
IL-5 (p= 0 ,010)	1	0,149	<b>0,009*</b>
HGF (p= 0 ,007)	0,798	<b>0,027*</b>	<b>0,013*</b>
VEGF (p= 0 ,003)	1	0,059	<b>0,003*</b>
IFN-γ (p= 0 ,007)	1	0,353	<b>0,005*</b>
IFN-α (p= 0 ,004)	1	0,072	<b>0,004*</b>
IL-1RA (p= 0 ,008)	1	0,106	<b>0,007*</b>
TNF-α (p= 0 ,006)	1	0,123	<b>0,005*</b>
IL-2 (p= 0 ,006)	1	0,41	<b>0,008*</b>
IL-7 (p= 0 ,005)	1	0,61	<b>0,005*</b>
IP-10 (p= 0 ,010)	0,629	<b>0,027*</b>	<b>0,025*</b>
IL2-R (p= 0 ,100)	×	×	×
MIG (p= 0 ,081)	×	×	×
IL-4 (p= 0 ,102)	×	×	×
IL-8 (p= 0 ,012)	1	0,905	<b>0,01*</b>

Nota: Kruskal-Wallis ajustado pela correção Bonferroni (variáveis numéricas com distribuição não normal). FGF (fator de crescimento fibroblástico); GCS-F (fator estimulador de colônia de granulócitos); MIP (proteínas Inflamatórias de Macrófagos); MCP (proteína quimioatraente de monócitos); EGF (fator de crescimento epidérmico); HGF (fator de crescimento de hepatócitos); VEGF (fator de crescimento endotelial vascular); IFN (interferon); IP (proteína 10 induzida por interferon gama); MIG (monocina induzida por interferon gama); IL (interleucinas); TNFα (fator de necrose tumoral alfa). × = Sem significância estatística; \* = p<0,05.

When assessing the role of these inflammatory mediators in the development of clinical sub-phenotypes, the clinical complications found most frequently in our population were pain crisis with 95% (38), followed by infections with 50% (20), leg ulcers 17.5% (7), bone necrosis 15% (6), cholelithiasis 12.5% (5), and ACS with 10% (4). When evaluating the influence of these molecules on the development of clinicopathological aspects, a significant correlation of IL-10 with the development of bone necrosis was observed (p = 0,006), an association of IL-17 with pain crises was also observed (p = 0,041), IL-4 to pancreatitis events (p = 0,048) and



IL-8 with cardiomegaly (0,047). From the analysis, it was found that the development of bone necrosis was associated with a lower concentration of IL-10 in these patients compared to those patients who did not have such manifestation. The development of pain crisis was associated with a greater contraction of IL-17, while the development of pancreatitis was associated with an increase in IL-4. It was also observed that the development of cardiomegaly is associated with a higher concentration of IL-8 compared to patients who did not develop such a manifestation. In addition, we found trends in the association of MIP1A with necrosis ( $p = 0,081$ ), IL-12 and Eotaxin with pain crises ( $p = 0,094$  and  $p = 0,054$  respectively), IL-12, IL-17 and IL2R with sepsis ( $p = 0,091$ ), IL-10 with ACS ( $p = 0,053$ ), IL-4 with splenomegaly ( $p = 0,072$ ), IP-10 with cholelithiasis ( $p = 0,098$ ) and IL-5 ( $p = 0,054$ ), IL2R ( $p = 0,063$ ), MIG ( $p = 0,094$ ) and IL-4 ( $p = 0,094$ ) with cardiomegaly. We hypothesize that the small number of patients who developed certain complications may have masked evidence of association. The other cytokines, chemokines, and growth factors did not show statistically significant differences regarding the clinical manifestations developed by these patients, although some correlate with the severity of the disease.

Table 2. Concentration of inflammatory mediators in the development of clinical sub-phenotypes.

	STROKE		BONE NECROSIS		LEG ULCERS		PAIN CRISES		SEPSIS		ACS		PULMONARY HYPERTENSION		INFECTIONS		DEVELOPMENTAL DELAY		PANCREATITIS		CHOLELITHIASIS		HEPATOSPLENO MEGALY		SEIZURES		CARDIOMEGALY	
	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
<b>FGF (pg/mL)</b>	10,69	11,45	11,25	7,69	11,30	7,95	8,63	10,82	10,75	9,36	10,64	11,39	10,69	11,45	8,06	13,36	10,80	7,149	10,27	16,19	10,49	12,28	10,64	13,37	10,64	13,37	10,75	9,94
<b>IL-1B (pg/mL)</b>	7,54	7,83	7,70	6,71	7,71	6,77	7,29	7,56	7,62	4,67	7,23	10,39	7,54	7,83	6,56	8,54	7,65	3,46	7,50	8,09	7,32	9,15	7,47	10,45	7,47	10,45	7,62	6,16
<b>G-CSF (pg/mL)</b>	114,3	170,6	115,6	116,2	117,58	107,00	91,00	117,0	115,6	117,0	113,5	135,7	114,32	170,64	111,32	120,14	116,80	73,81	114,55	130,27	110,62	151,47	114,37	168,66	114,37	168,6	114,23	144,16
<b>IL-10 (pg/mL)</b>	15,90	8,67	<b>17,23</b>	<b>7,17<sup>a</sup></b>	15,63	16,14	12,56	15,89	15,79	12,92	14,33	28,26	15,90	8,67	14,10	17,34	15,90	8,80	15,16	22,59	15,07	20,25	15,76	14,26	15,76	14,26	15,06	28,27
<b>IL-13 (pg/mL)</b>	14,07	25,45	14,86	11,49	14,56	13,40	10,33	14,57	14,37	13,83	13,69	20,37	14,07	25,45	12,48	16,23	14,52	8,02	13,83	20,81	13,55	20,02	14,11	23,95	14,11	23,95	14,00	21,20
<b>IL-6 (pg/mL)</b>	5,99	7,83	6,10	5,66	6,31	4,73	4,53	6,11	6,04	5,83	6,03	6,06	5,99	7,83	4,65	7,41	6,09	3,59	6,12	4,98	5,98	6,42	6,07	4,39	6,07	4,39	6,06	5,58
<b>IL-12 (pg/mL)</b>	144,8	194,7	148,1	134,5	148,7	133,3	263,0	139,9	140,4	364,9	150,1	109,4	144,8	194,7	150,8	141,3	145,4	172,7	145,9	148,3	149,8	119,6	146,4	131,4	146,4	131,4	145,4	158,4
<b>EOTAXIN (pg/mL)</b>	47,17	42,56	48,70	37,74	46,76	48,46	91,02	44,74	45,41	111,2	48,30	35,89	47,17	42,56	49,16	44,95	47,40	33,61	47,16	45,76	47,64	42,93	46,60	64,74	46,60	64,74	45,02	85,69
<b>IL-17 (pg/mL)</b>	27,18	11,23	27,43	23,06	29,32	14,81	<b>21,32</b>	<b>130,4<sup>b</sup></b>	22,74	184,1	26,84	26,20	27,18	11,23	25,27	28,29	27,34	5,07	28,32	7,77	29,55	7,36	27,19	10,89	27,19	10,89	27,80	7,46
<b>MIP-1A (pg/mL)</b>	33,97	49,96	35,25	29,38	34,41	34,14	31,19	34,53	34,25	38,84	33,76	39,81	33,97	49,96	32,11	36,62	34,55	27,30	33,57	44,14	33,63	39,53	34,05	46,68	34,05	46,68	33,93	42,56
<b>MIP-1B (pg/mL)</b>	58,95	96,02	62,07	47,46	62,30	48,47	47,00	60,56	59,83	61,92	55,29	101,1	58,95	96,02	52,27	67,49	59,99	55,67	55,87	109,32	56,46	83,81	59,14	88,54	59,14	88,54	59,53	66,59
<b>MCP-1 (pg/mL)</b>	158,0	309,7	161,4	163,8	172,1	113,1	130,4	163,4	161,2	184,1	156,8	206,8	158,0	309,7	137,6	186,0	162,2	145,4	152,5	275,8	151,7	232,3	159,3	258,6	159,3	258,6	162,8	142,0
<b>IL-15 (pg/mL)</b>	51,07	79,25	53,93	39,55	53,43	43,97	36,08	52,60	51,95	44,98	50,89	59,68	51,07	79,25	40,87	62,67	52,48	24,16	50,12	72,11	49,80	65,55	50,57	98,71	50,57	98,71	52,11	45,32
<b>EGF (pg/mL)</b>	11,07	15,11	11,67	8,34	11,52	9,53	7,71	11,35	11,20	10,03	10,96	13,07	11,07	15,11	8,64	13,70	11,30	6,09	10,88	14,72	10,90	13,07	11,08	14,54	11,08	14,54	11,19	10,71
<b>IL-5 (pg/mL)</b>	5,76	10,20	6,12	4,51	5,96	5,48	4,54	5,94	5,84	7,07	5,58	8,47	5,76	10,20	5,26	6,48	5,97	2,01	5,59	9,38	5,45	8,85	5,70	12,67	5,70	12,67	5,58	11,48
<b>HGF (pg/mL)</b>	218,4	297,6	229,3	169,8	224,0	203,0	280,3	217,2	218,3	300,6	215,6	263,4	218,4	297,6	205,3	235,4	221,1	193,5	214,7	290,8	216,4	248,3	218,3	299,7	218,3	299,7	213,7	346,5
<b>VEGF (pg/mL)</b>	4,21	6,91	4,38	3,75	4,29	4,22	3,82	4,31	4,27	4,64	4,25	4,58	4,21	6,91	3,90	4,67	4,27	4,90	4,13	6,14	4,19	4,89	4,24	5,86	4,24	5,86	4,16	6,63
<b>IFN-γ (pg/mL)</b>	16,74	25,15	17,05	16,39	16,79	17,69	15,55	17,02	16,88	19,70	16,61	19,95	16,74	25,15	15,65	18,24	17,03	13,74	16,50	22,44	16,20	22,19	16,80	22,77	16,80	22,77	16,84	18,99
<b>IFN-α (pg/mL)</b>	26,34	42,74	27,31	23,56	26,75	26,75	21,12	27,04	26,78	25,34	26,22	31,45	26,34	42,74	24,46	29,03	26,95	18,77	26,16	34,04	25,75	33,69	26,34	42,77	26,34	42,77	26,49	31,65
<b>IL-1RA (pg/mL)</b>	166,7	80,68	80,90	93,75	85,32	71,06	65,08	83,76	83,43	59,27	84,14	71,00	166,7	80,68	82,82	82,84	178,60	80,37	80,94	106,11	85,97	60,80	82,75	85,98	82,75	85,98	82,52	88,69
<b>TNF-α (pg/mL)</b>	5,62	10,83	5,92	4,75	5,66	6,16	4,06	5,84	5,77	5,11	5,53	7,71	5,62	10,83	5,07	6,43	5,81	3,31	5,51	8,76	5,43	8,00	5,65	9,44	5,65	9,44	5,61	8,36
<b>IL-2 (pg/mL)</b>	3,11	4,31	3,26	2,42	3,25	2,58	2,50	3,17	3,14	3,09	3,10	3,44	3,11	4,31	2,51	3,76	3,16	2,04	3,08	3,78	3,09	3,45	3,09	5,05	3,09	5,05	3,13	3,30
<b>IL-7 (pg/mL)</b>	6,69	14,25	6,86	7,00	6,88	6,90	6,42	6,91	6,77	11,16	6,52	10,09	6,69	14,25	5,81	7,95	7,00	2,46	6,44	12,31	6,18	11,76	6,76	11,59	6,76	11,59	6,67	10,83
<b>IP-10 (pg/mL)</b>	26,93	123,4	27,05	42,35	31,45	19,43	22,85	29,69	29,76	13,29	29,83	24,96	26,93	123,40	28,09	30,60	28,51	62,05	28,34	41,78	30,87	18,70	29,84	9,89	29,84	9,89	29,32	29,79
<b>IL2-R (pg/mL)</b>	205,3	258,0	214,3	163,2	217,0	157,7	378,4	197,6	197,7	553,4	208,3	191,6	205,3	258,0	220,8	192,5	208,9	117,6	208,5	183,3	212,6	165,1	200,9	429,9	200,9	429,9	203,1	273,2
<b>MIG (pg/mL)</b>	141,9	202,1	150,3	104,3	151,0	107,2	111,2	145,1	143,7	131,8	147,7	104,2	141,9	202,1	163,8	122,9	143,4	141,9	145,1	122,3	152,0	82,7	144,7	90,2	144,7	90,2	138,7	231,4
<b>IL-4 (pg/mL)</b>	12,49	10,72	13,08	8,847	13,19	8,92	11,18	12,51	12,44	12,64	12,54	11,58	12,49	10,72	9,41	15,48	12,50	10,38	<b>9,20</b>	<b>52,42<sup>c</sup></b>	9,28	34,61	12,46	11,90	12,46	11,90	12,45	12,40
<b>IL-8 (pg/mL)</b>	11,23	28,03	12,22	8,40	7,74	30,07	6,66	11,91	11,69	10,03	11,64	11,75	11,23	28,03	13,91	9,39	11,90	1,90	11,62	11,94	11,83	10,38	11,61	13,06	11,61	13,06	<b>7,24</b>	<b>95,35<sup>d</sup></b>

Note: Kruskal-Wallis (numerical variables with non-normal distribution). a) p=0.006; b) p=0.041; c) p=0.048; d) p = 0.04

## DISCUSSION

The SCA phenotypic heterogeneity cannot be explained only by the presence of a single mutation in the globin gene or only by the modulation of HbF. Inflammatory mediators that potentially influence the pathogenesis of SCA have been studied. Sickle cell anemia is a disease characterized by acute and chronic inflammation, and both vaso-occlusive and hemolysis manifestations are associated with inflammatory events, with the production of cytokines (1,4). In our study, changes in the plasma concentrations of these inflammatory proteins were evident. Our data demonstrated that patients with SCA showed an increase in most inflammatory markers: IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6, IL-12, MIP1B, HGF, IL1RA, IP-10, IL2-R, MIG, IL -4, and IL-8 in addition to reduced levels of GCSF, IL-13, Eotaxin, IL-17, MIP1A, MCP-1, IL-5, IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$  and IL-7 and unchanged levels of FGF, IL-15, EGF, VEGF, and IL-2 when compared to controls.

The immune system seems to play a fundamental role in SCA morbidity (5). In our study, the evaluation of these inflammatory mediators in the clinical course of the disease with possible associations and severity scores demonstrated that systemic levels of these molecules are associated with variability in the degree of severity of the disease. Statistically significant differences in patients with a more severe profile from those with a milder clinical profile were found.

Studies have sought to correlate concentrations with the development of certain manifestations. Barbu *et al.* (2020) demonstrated high levels of IL-6 and IL-1 $\alpha$ , IL-1ra and adhesion molecules in patients with vaso-occlusive crises (4). Another study found that patients who had a higher frequency of vaso-occlusive crises, acute chest syndrome, leg ulcers, osteonecrosis, stroke, and priapism had higher levels of IL-6 compared to patients without these clinical complications, and levels increased IL-8 in patients with leg ulcers (6). In addition, studies related to strokes have demonstrated supra-regulation of IL-6 and TNF- $\alpha$ , 1 (MCP-1), and IL-1 $\beta$ , IL-8, and IL-10 (7). The exacerbation of IL-1 and TNF- $\alpha$  in brain damage and neuroprotection of IL-6, IL-10, and TGF- $\beta$  was also observed (8). Levels of inflammatory cytokines IL1 $\beta$ , IL6, IL10, and TNF- $\alpha$  were also elevated in patients in crisis state SCA and IL12 and IL8 in patients with crisis state SCA and in steady state (9). Given the above, in our study, when analyzing the concentration of these inflammatory mediators in the development of clinical sub-phenotypes, we found a decrease in IL-10, an anti-inflammatory cytokine that has the function of inhibiting other cytokines, and also a decrease in IL1-RA, an inhibitor of

IL1 in patients who developed stroke when compared to those who did not, leading to a reduction in the capacity for protective modulation of the immune and inflammatory response in the development of this manifestation.

When assessing the role of these inflammatory mediators in the development of clinical sub-phenotypes, our study showed that the increase in the concentration of IL-17 is associated with the development of pain crises ( $p = 0041$ ), corroborating the literature in the development of a pro-acute inflammatory state. IL-17 is a pro-inflammatory cytokine that activates macrophages and endothelial cells in the production of IL-6, IL-8, and TNF $\alpha$ . In other words, TNF $\alpha$  is one of the main mediators of the acute inflammatory response, which stimulates the expression or release of adhesion molecules, prostaglandins, a platelet-activating factor, and stimulates the production of IL-6 (10). Despite not showing statistical inference, the concentration of IL-12, eotaxin HGF, and IL2-R were reduced in patients who developed pain attacks, concerning those who developed; on the other hand, the remaining 19 cytokines out of the 28 tested cytokines were found to be elevated in patients who developed pain attacks. Our discovery supports the idea of previous studies that present IL-17 as a promoter of a pro-inflammatory state leading to the induction of secretion of IL-6 and IL-8 in addition to intracellular adhesion molecules. Thus, the pain resulting from microcirculatory Ischemia, with tissue hypoxia secondary to obstruction together with inflammatory stress, seems to be fundamental factors in maintaining this manifestation. This view is supported by Alagbe et al. (2018), who demonstrated that adult patients with sickle cell anemia in a bone pain crisis had elevated pro-inflammatory cytokines (11).

Our data also pointed to a significant association of decreased IL-10 as a predictor for the development of bone necrosis ( $p = 0,006$ ). It has already been shown that the regulation of bone homeostasis is directly involved with the immune system and that the state of chronic inflammation seems to influence this balance (12,13). Our results corroborate previous studies that also found a significant decrease in this anti-inflammatory molecule in the development of osteonecrosis. Adaptala et al (2016) showed in a study in ischemic osteonecrosis an overexpression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6) and a suppression in the levels of anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) in patients (14). However, our study demonstrated practically unchanged levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6 when comparing the levels between patients who developed bone necrosis and those who did not develop such a manifestation — perhaps because they were stable patients.

IL-8 leads to the activation of neutrophils, which are the first to be recruited when a vascular lesion starts, contributing to the onset and spread of inflammation, increasing adhesion to the endothelium of sickle cells and compromising microcirculation, causing dilation and hypertrophy of the ventricles and valve insufficiencies (11,15). Analysis of the levels of this inflammatory mediator in phenotypic variability revealed that IL-8 appears to impact the development of cardiomegaly. In addition, although the levels of IL-2 were practically unchanged among individuals who developed cardiomegaly and those who did not, the concentration of their IL2-R receptor was supra-regulated. In addition, IL-17 levels were 3 times lower than those who did not develop such a complication, suggesting that reduced levels of IL-17 may favor the risk of infection (16). The importance of the balance between these molecules is emphasized here. It is also worth mentioning that the plasma levels of IL-8 do not appear to be significantly different in patients with SCA who were using HU (17).

We also revealed that the incidence of pancreatitis appears to correlate significantly with increased levels of IL-4, indicating an exacerbated inflammatory response. The increase in this cytokine is justified by the fact that IL-4 is a glycoprotein that works by reducing the effects of other cytokines such as IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, and IL-8, inhibiting the production of oxygen free radicals and positively regulating the expression of the IL-1 receptor antagonist — essential mechanisms in the regulation of systemic inflammation of pancreatitis (18). Xue *et al.* (2016) demonstrated that inhibitory therapy with IL-4 / IL-13 in humans and mice decreases the activation of macrophages and reduces fibrosis, suggesting that these cytokines are fundamental in the pathogenesis of pancreatitis (19,20). In our study, we did not significantly evidence the influence of IL-13; however, it was observed an increase in the concentrations of this cytokine in patients who developed such a clinical manifestation.

Although no significant associations were observed in our study concerning other clinical manifestations, our results support evidence from previous studies on the concentration of these mediators. Domingos *et al.* (2020) evaluated the clinical impact of the pro-inflammatory cytokines of IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8 in patients with SCA, and it was observed that patients who had a more significant presence of vaso-occlusive crises events, acute chest syndrome, leg ulcers, osteonecrosis, stroke, and priapism had higher levels of IL-6 compared to patients without these clinical complications and increased levels of IL-8 in patients who developed leg ulcers (6). In our population, we also found supra-regulated levels of IL-1 $\beta$  in the manifestations of ACS, Hepatosplenomegaly, and seizures. IL-6 was higher in patients who developed stroke, pulmonary hypertension, and infections. In turn, IL-8 was overexpressed in

patients who developed stroke, leg ulcers, pain attacks, pulmonary hypertension, and cardiomegaly.

Among the families of cytokines, chemokines, and growth factors, the IL-1 family was mainly linked to this chronic and acute inflammation process, where IL-1 $\beta$  has been a key factor as a biomarker of studies in autoinflammatory diseases in systemic inflammatory conditions. (21). In our population, we demonstrated that the severity of the disease and some manifestations seem to be influenced by the concentration of IL-1 $\beta$ . Despite presenting itself as a pro-inflammatory cytokine with antioxidant defense, through negative feedback caused by the exacerbation of inflammation, this cytokine leads to an activation of endothelial cells, presenting itself as a pathogenetic mediator of brain damage. Studies suggest that IL-1 $\beta$  is a potent inflammatory mediator produced in the cerebral parenchyma showing a significant role of this cytokine in stroke development, relating it with high predictive power (22). Our data did not reveal a statistically significant difference in IL-1 $\beta$  between patients who developed stroke and those who did not. However, it was observed that patients who developed stroke, pulmonary hypertension, and developmental delay suppressed more than 100% of the IL-1 antagonist receptor (IL1RA). This finding is consistent with the evidence found in the literature that presents the idea that the concentrations of IL-1 $\beta$  versus IL1RA tend to influence the severity of some diseases. This concept hypothesizes that a decrease in IL1RA or even its functional loss leads to the maximization of IL-1 $\beta$  activity, and the inflammation induced by this cytokine occurs in an uncontrolled way (21).

For ACT, we observed an increase in IL-1 $\beta$  in patients who developed such an event, corroborating Vats *et al.* (2020), who demonstrated that IL-1 $\beta$  promotes vaso-occlusion in sickle cell anemia through platelets dependent inflammasome leading to acute chest syndrome (23). On the other hand, Ischemia leads to an inflammatory response triggered by several inflammatory factors and mediators (7). The cytokines most related to stroke to date are IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10, and TGF $\beta$  (24). TNF $\alpha$  has a direct contribution to stroke, associated with the severity of functional impairment. Increased levels of this cytokine have been found in patients after the development of stroke. In our study, TNF $\alpha$  levels were also positively regulated in patients who developed the manifestation. However, conflicting results on the action of this cytokine on stroke have been presented, perhaps due to the possible affinity with receptors and balance between them.

The lack of knowledge of cytokine levels before starting HU therapy, due to the characterization of the study as cross-sectional, did not allow a better analysis of the effect of this drug on inflammatory mediators and not representing the trend of values over time within an individual. However, a recently published study showed that HU could reduce serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 concerning baseline but without reaching the healthy control value (25). A recent survey by Barbu *et al.* (2020) demonstrated that the environment remained highly inflammatory even during treatment with Hydroxyurea; in addition, this treatment probably contributed to specific cellular inflammatory responses (4). Another study by Lanaro *et al.* (2009) also showed no evidence of the influence of HU therapy on the alteration of IL-10 levels in patients with SCA (17).

A comparative proteomic study of purified neutrophils in patients with sickle cell anemia demonstrated a significantly increased level of IFN $\alpha$  in the plasma of SCA patients compared to controls (26). In our study, the mean serum IFN $\alpha$  level was higher in SCA patients when compared to the control group, with a significant difference compared to the levels of disease severity.

Sarray and Almawi (2015), in turn, demonstrated the contribution of reduced levels of interleukin-10 to the pathogenesis of osteomyelitis in children with sickle cell anemia (27). In another study, the same author showed a negative correlation with the frequency, type, severity, and duration of vaso-occlusive events. In our population, when compared to individuals without the pathology, IL-10 was overexpressed, corroborating the idea that this results from feedback from biochemical mechanisms and anti-inflammatory molecules that seek a return to homeostasis to contain chronic inflammation through positively regulated molecules and anti-inflammatory pathways. In addition, we hypothesized that the use of Hydroxyurea by this population would be providing an increase in the levels of this cytokine for a probable response to the clinical improvement of vaso-occlusive manifestations. However, when associated with the clinical course, Sarray *et al.* (2015) demonstrated lower levels of IL-10 during vaso-occlusive crises (28), supporting our results — when we demonstrated a significant decrease in this interleukin in patients who developed stroke, bone necrosis, and pulmonary hypertension. This view is supported by studies that have shown that IL-10 levels are increased at a steady state but reduced when compared to patients without clinical manifestations who are in vaso-occlusive crisis (17,28,29).

In our study, IL-6 was significantly overexpressed concerning controls, corroborating previous studies that demonstrate its increase in pathology. However, when associated with clinical manifestations, its expression did not show any statistical difference compared to individuals who developed such manifestations compared to those who did not develop it. The results presented here are consistent with previous studies, which showed that IL-6 decreased significantly compared to baseline but did not reach the value of healthy control in patients treated with HU (25).

Given the above, the identification of inflammatory modulators that are associated with the development of clinical manifestations with a consequent role in the clinical severity of the disease and that can predict the development of certain complications opens up possibilities for a prognosis with potential clinical utility in individualizing the treatment of these patients. We hypothesize that levels of these cytokines are crucial in the clinical presentation of these patients, increasing the probability of occurrence with consequent worsening and increase in morbidity and mortality. Thus, understanding the pathophysiology of these mediators underlying clinical phenotypes can provide prognostic biomarkers for individualized treatment of these individuals with potential clinical utility.

## CONCLUSION

The present study showed significant differences in inflammatory mediators compared to people without the disease. Concerning severity, concentrations were shown to be of great importance in developing more severe phenotypes of the disease. These findings point to an essential role of these inflammatory mediators in the SCA clinical course. Thus, our results suggest that the levels of these inflammatory mediators can be used as predictors for specific clinical manifestations and mainly for the prognosis of clinical severity. Continuing this study with a larger sample is recommended to rule out possible evidence of association and validate the demonstrated associations.

## DECLARATION OF CONFLICTS OF INTERESTS

The author (s) have declared no potential conflict of interest concerning the research, authorship and/or publication of this article.



## REFERENCES

1. Carvalho MOS, Araujo-Santos T, Reis JHO, Rocha LC, Cerqueira BAV, Luz NF, et al. Inflammatory mediators in sickle cell anaemia highlight the difference between steady state and crisis in paediatric patients. *Br J Haematol.* 2018;182(6):933–6.
2. Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. Sickle cell disease. *Lancet* [Internet]. 2017;390(10091):311–23. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30193-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30193-9)
3. Pathare A, Al Kindi S, Daar S, Dennison D. Cytokines in sickle cell disease. *Hematology.* 2003;8(5):329–37.
4. Barbu EA, Mendelsohn L, Samsel L, Thein SL. Pro-inflammatory cytokines associate with NETosis during sickle cell vaso-occlusive crises. *Cytokine* [Internet]. 2020;127(July 2019):154933. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154933>
5. Garcia NP, Júnior ALS, Soares GAS, Costa TCC, Dos Santos APC, Costa AG, et al. Sickle cell anemia patients display an intricate cellular and serum biomarker network highlighted by TCD4+CD69+ lymphocytes, IL-17/mIP-1  $\beta$ , IL-12/vegf, and IL-10/IP-10 axis. *J Immunol Res.* 2020;2020.
6. Domingos IF, Pereira-martins DA, Sobreira MJVC, Oliveira RTD. High levels of proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8 are associated with a poor clinical outcome in sickle cell anemia. *Ann Hematol.* 2020;
7. Ahmad M, Dar N, Bhat Z, Hussain A, Shah A, Liu H, et al. Inflammation in Ischemic Stroke: Mechanisms, Consequences and Possible Drug Targets. *CNS Neurol Disord - Drug Targets.* 2014;13(8):1378–96.
8. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol.* 2007;184(1–2):53–68.
9. Carvalho MOS, Araujo-Santos T, Reis JHO, Rocha LC, Cerqueira BA V., Luz NF, et al. Inflammatory mediators in sickle cell anaemia highlight the difference between steady state and crisis in paediatric patients. *Br J Haematol.* 2018;182(6):933–6.
10. Qari MH, Dier U, Mousa SA. Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. *Clin Appl Thromb.* 2012;18(2):195–200.
11. Alagbe AE, Olaniyi JA, Aworanti OW. Adult sickle cell anaemia patients in bone pain crisis have elevated pro-inflammatory cytokines. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2018;10(1):1–9.
12. Ma J, Guo W, Li Z, Wang B, Li S, Wang P. Hip Osteonecrosis Is Associated with Increased Plasma IL-33 Level. *Mediators Inflamm.* 2017;2017.
13. Frommer KW, Neumann E, Lange U. Inflammation and bone: osteoimmunological aspects. *Z Rheumatol.* 2016;75(5):444–50.

14. Adapala NS, Yamaguchi R, Phipps M, Aruwajoye O, Kim HKW. Necrotic Bone Stimulates Proinflammatory Responses in Macrophages through the Activation of Toll-Like Receptor 4. *Am J Pathol* [Internet]. 2016;186(11):2987–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.06.024>
15. Chacko P, Kraut EH, Zweier J, Hitchcock C, Raman S V. Myocardial infarction in sickle cell disease: Use of translational imaging to diagnose an under-recognized problem. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013;6(5):752–61.
16. Da Silva RR, Pereira MC, Melo Rêgo MJB, Domingues Hatzlhofer BL, Da Silva Araújo A, Cavalcanti Bezerra MA, et al. Evaluation of Th17 related cytokines associated with clinical and laboratorial parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine* [Internet]. 2014;65(2):143–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.11.012>
17. Lanaro C, Albuquerque DM, Saad STO, 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 endothelium , and endothelial injury contribute to when compared with control individuals . HU therapy. *J Leukoc Biol*. 2009;85(February):235–42.
18. Zhang C, Ge CL, Guo RX, He SG. Effect of IL-4 on altered expression of complement activation regulators in rat pancreatic cells during severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2005;11(43):6770–4.
19. Xue J, Sharma V, Hsieh MH, Chawla A, Murali R, Pandol SJ, et al. Alternatively activated macrophages promote pancreatic fibrosis in chronic pancreatitis. *Nat Commun* [Internet]. 2016;176(10):139–48. Available from: file:///C:/Users/Carla Carolina/Desktop/Artigos para acrescentar na qualificação/The impact of birth weight on cardiovascular disease risk in the.pdf
20. Manohar M, Verma AK, Venkateshaiah SU, Mishra A. Immunological Responses Involved In Promoting Acute and Chronic Pancreatitis. *Clin Immunol Res*. 2017;1(1):1–8.
21. Dinarello CA, Dc W, Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood J*. 2013;3720–32.
22. Asare K, Gee BE, Stiles JK, Wilson NO, Driss A, Quarshie A, et al. Plasma interleukin-1 $\beta$ (beta) concentration is associated with stroke in sickle cell disease. *Cytokine*. 2011;49(1):39–44.
23. Vats R, Brzoska T, Bennewitz MF, Jimenez MA, Pradhan-sundd T, Tutuncuoglu E, et al. Platelet Extracellular Vesicles Drive Inflammation – IL-1 $\beta$  – Dependent Lung Injury in Sickle Cell Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;201:33–46.
24. Bonaventura A, Liberale L, Vecchié A, Casula M, Carbone F, Dallegri F, et al. Update on inflammatory biomarkers and treatments in ischemic stroke. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):1–53.
25. Zahran AM, Nafady A, Saad K, Hetta HF, Abdallah AEM, Abdel-Aziz SM, et al. Effect of Hydroxyurea Treatment on the Inflammatory Markers Among Children With Sickle

Cell Disease. *Clin Appl Thromb*. 2020;26.

26. Hermand P, Azouzi S, Gautier EF, Guillonneau F, Bondet V, Duffy D, et al. The proteome of neutrophils in sickle cell disease reveals an unexpected activation of the interferon alpha signaling pathway. *Haematologica*. 2020;105(12):2851–4.
27. Sarray S, Almawi WY. Contribution of reduced interleukin-10 levels to the pathogenesis of Osteomyelitis in children with sickle cell disease. *Clin Vaccine Immunol*. 2015;22(9):1020–4.
28. Sarray S, Saleh LR, Lisa Saldanha F, Al-Habboubi HH, Mahdi N, Almawi WY. Serum IL-6, IL-10, and TNF $\alpha$  levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. *Cytokine* [Internet]. 2015;72(1):43–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.11.030>
29. Conran; N, Belcher JD. Inflammation in Sickle Cell Disease. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018;68(1):263–99.

**PHENOTYPIC PROFILE STRATIFICATION OF SICKLE CELL ANEMIA AS A TOOL FOR THE PREDICTION OF SEVERITY, POTENTIAL CLINICAL UTILITY, AND ACCESSIBILITY TO INDIVIDUALIZED THERAPY**

Ianaê Indira Wilke<sup>1,2</sup>, Daniela Richter<sup>2</sup>, Annelise Pezzi<sup>1,2</sup>, Vanessa Valim<sup>2</sup>, Maria Aparecida da Silva<sup>2</sup>, Bruna Amorim<sup>2</sup>, Filipe Sehn<sup>1,2</sup>, Raul Marques Rodrigues<sup>3</sup>, Nicole Kilian<sup>3</sup>, Lúcia Silla<sup>4</sup>.

1. Post-graduation in Medicine: Medical Sciences - Federal University of Rio Grande do Sul.
2. Laboratory of Cell Culture and Molecular Analysis of Hematopoietic Cells from the Research Center of the Hospital das Clínicas of Porto Alegre
3. Graduation student of the Laboratory of Cell Culture and Molecular Analysis of Hematopoietic Cells of the Research Center of the Hospital of Clinics of Porto Alegre
4. PhD. Professor, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, head of the Laboratory of Cell Culture and Molecular Analysis of Hematopoietic Cells of the Research Center of the Hospital das Clínicas of Porto Alegre.

Correspondence:

Professora Dra. Lucia Silla, MD, PhD

Laboratório de Cultura Celular e Análise Molecular de Células Hematopoiéticas

Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcellos, 2350

CEP: 90035-903- Porto Alegre/RS, Brasil

Phone number: +55 (51) 3359-8317

E-mail: lsilla@hcpa.ufrgs.br

## ABSTRACT

Although classified as a monogenic disease, sickle cell anemia (SCA), caused by a single point mutation in the globin gene, has a phenotypic heterogeneity that is determined in a multifactorial way. It is necessary to distinguish between determinants associated with the severity of the disease to build a tool that makes it possible to identify the increased risk for a more serious clinical course, guiding therapeutic decision-making and benefiting these patients with targeted and earlier treatment. Given this, the objective of our work was, through our analyses, to develop a model of phenotypic stratification with potential clinical utility in predicting severity and targeting specific therapies. This cohort study involved 197 individuals, of whom 65 healthy donors, normal adult individuals (HbAA), blood bank donors at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), and 132 homozygous patients for the hemoglobin S genotype under medical follow-up at the HCPA Sickle Cell Anemia Reference Center in a stationary state. The recruitment took place between 2013 and 2014 with the collection of 2,5 ml of peripheral blood for further analysis of polymorphisms, quantification of cytokines, chemokines, growth factors, and analysis of microRNA expression. Retrospective data collection had an average follow-up of 31,8 years, and patients were followed up prospectively for 6 years. From the research on medical records and exams obtained from the hospital services, information related to clinical manifestations, biochemical and hematological data were extracted. Using severity predictors already established and our analysis, we developed a phenotypic stratification with consequent SCA clinical severity. Our final model is presented as a stratification table with a set of biomarkers conditioned to the severity of the disease and the probability of the occurrence of events associated with the clinical, laboratory, genetic, post-transcriptional regulation, and inflammatory mediators. Criteria for stratification of sickle cell anemia in mild and severe according to the state of the disease and potential clinical utility that supports decision making, but that may also be used in the future as a tool for predicting severity in these patients were established.

## INTRODUCTION

Sickle cell anemia (SCA) is now the most prevalent genetic disease worldwide. Genetic characteristics of individuals and the possible heterogeneity of molecules associated with hemolysis and vasculopathy are responsible for various clinical manifestations and complications.

Classified as a monogenic autosomal recessive inheritance disease conditioned by the homozygous presence of hemoglobin S (HbSS), SCA is caused by a single missense mutation at position 6 of the beta-globin chain with the replacement of glutamic acid by valine, which will characterize it with the ability to polymerize hemoglobin when deoxygenated, inducing its rigidity, hemolytic anemia, vaso-occlusion, and hemolysis. The sickle cell will eventually induce a cascade of pleiotropic effects that will determine the clinical condition in these individuals. Such phenotypic variability is characteristic of the disease, presenting clinical manifestations that vary from mild to more severe forms associated with high mortality rates.

Classified as a monogenic autosomal recessive inheritance disease conditioned by the homozygous presence of hemoglobin S (HbSS), SCA is caused by a single missense mutation at position 6 of the beta-globin chain with the replacement of glutamic acid by valine, which will characterize it with the ability to polymerize hemoglobin when deoxygenated, inducing its rigidity, hemolytic anemia, vaso-occlusion, and hemolysis. The sickle cell will eventually induce a cascade of pleiotropic effects that will determine the clinical condition in these individuals. Such phenotypic variability is characteristic of the disease, presenting clinical manifestations that vary from mild to more severe forms associated with high mortality rates.

Although it is a monogenic pathology caused by a single nucleotide polymorphism (SNP), several factors have shown a fundamental role in variations in the severity of the disease. The pathology is currently classified through crisis rates, classified as sickle cell anemia "with" or "without" crisis, with a highly restricted scope for a multifactorial disease. There are no specific treatments for SCA; the treatments currently available aim to mitigate the clinical manifestations and, consequently, provide a better quality of life for these patients.

Given this context, the systematic identification of factors that contribute to the pathology, together with the study and elucidation of the severity-modulating components of this disease, may offer opportunities for new perspectives for the rational exploration of the parameters in the regulatory mechanisms and damages of this physiological condition enabling

stratification of phenotypes with a subsequent prediction of disease severity and clinical use for individualized treatments.

## MATERIAL AND METHODS

### Samples

This study involved 197 individuals, of whom 65 healthy donors, normal adult individuals (HbAA), blood bank donors at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), and 132 homozygous patients for the hemoglobin S genotype under medical follow-up at the HCPA Sickle Cell Anemia Reference Center in a stationary state. This is an observational cohort study designed to analyze the disease severity modulators at a multifactorial level, to further rational explore the data in the stratification of the phenotypic profile. Recruitment took place between 2013 and 2014 with 2,5 ml of peripheral blood collection for further analysis. From the research in medical records, information was extracted regarding clinical manifestations such as Systolic Blood Pressure, Stroke, Bone Necrosis, Transfusions, Ulcers, Pain crisis, Sepsis, Acute Chest Syndrome (ACS), Pulmonary Hypertension, Splenomegaly, Infections, Developmental Delay, Pancreatitis, Cholelithiasis, Hepatosplenomegaly, Convulsive Seizures, Intracranial Hypertension, Cardiomegaly, and the total number of complications. In addition to retrospective data collection with a mean follow-up of 33,5 years, patients were followed prospectively for 6 years. The exclusion criteria encompassed all individuals who had a different Hb variant than Hb S, use of any medication other than HU, and who received blood transfusions in the 3 months before collection.

## ASSESSMENT INSTRUMENTS

### Polymorphisms

For Polymorphism analysis, 350 µl of peripheral blood was used to extract genomic DNA through the Qiagen Puregene Blood kit. The genotyping of the polymorphisms was carried out through a real-time polymerase chain reaction by Taq-Man. The genetic variants

were selected from 6 SNPs validated in 3 *loci* identified as the primary HbF modifiers: SNP BCL11A, SNP HBS1L-MYB, and SNP HBG2-XMN1.

## Cytokine

For cytokine analysis, 50 µl of serum was used. Cytokines, chemokines, and growth factors were quantified using the Cytokine Human Magnetic 30-Plex Panel for the Luminex™ platform. Thirty analytes were analyzed simultaneously: EGF, Eotaxin, basic FGF, G-CSF, GM-CSF, HGF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-2 $r$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 $\alpha$ , MIP -1 $\beta$ , RANTES, TNF- $\alpha$ , and VEGF.

## MicroRNAs

For MicroRNAs analysis, 1,0 ml of peripheral blood was used. The miRNA was extracted by the Paxgene Blood kit microRNA, and its quality was assessed using the Nanodrop spectrophotometer. The TaqMan kit was used for reverse transcription according to the manufacturer's specifications for the selected MicroRNAs (hsa-mir-15a, hsa-mir210, hsa-mir-144, and hsa-mir-223) and endogenous control (RNU 48).

## Biochemical, hematological data and clinical manifestations

The instrument for collecting data on biochemical, hematological, and clinical manifestations was done through medical records and tests obtained from the hospital services, where hematimetric indices and biochemical data were quantified according to the patient's follow-up routine. The laboratory values were compared to reference values of the general population without the pathology and the average of values already published for the sickle cell population.

## ETHICAL ASPECTS

The present study followed the guidelines and regulatory norms for research involving human beings, approved by the HCPA research ethics committee under the number 190100585.



Each individual or their guardians signed a written informed consent form, where they received the necessary information about the nature of the research. After the agreement, they signed two copies of this document that authorizes the use of biological material in the present research. To guarantee the patients' anonymity, the identification data were kept confidential, being replaced by ordinal numbers to guarantee their privacy.

## DATA PROCESSING AND STATISTICAL ANALYSIS

Initially, the individuals included in the study were divided into two groups: patients with SCA and individuals without the pathology. Data distribution was verified by the Shapiro-Wilk test and Fisher's test for more than one independent variable. The comparison between the group of patients and the control group was performed using Student's T-test for samples with categorical normal distribution and ANOVA for more than one independent variable. Data that did not show a normal distribution were analyzed using Mann-Whitney and Kruskal-Wallis for continuous variables. Correlations between laboratory parameters were performed using the Spearman correlation test. A multivariate linear regression analysis was performed with a stepwise criterion for selecting variables to assess the impact of severity with hematological, biochemical, genetic, and inflammation variables. For the stratification of the phenotypic profile, the quantitative variables will be categorized, and for those that do not have a cutoff point described in the literature, the median obtained from the healthy controls will be used. Mortality risk factors were analyzed by Cox proportional hazards regression. For the selection of variables to be included in the regression model, the utility of predicting severity (death) and a significance value of less than 20% in the univariate analysis were analyzed. Data analysis was performed using SPSS 20.0, with a significance level of 5%.

For the analysis of polymorphisms, categorical data were calculated as absolute and relative frequencies. For normal quantitative data, mean and standard deviation were used. Normality was observed by the Shapiro-Wilk test, followed by the Kruskal-Wallis test, used to compare more than 2 variables. The relative risk was calculated using Poisson regression to explore interactions associated with clinical severity and risk factors for the association between genotypes and the rate of occurrence of clinical manifestations. Hardy-Weinberg balance test was also used, in which it was verified if the frequencies of the alleles and genotypes were

constant in the studied population. After analysis of relative risk, genotype association tests and the distribution of HbF levels were performed. In the analysis of cytokines, chemokines, and growth factors, comparisons between variables and groups were made using the Mann-Whitney test for independent samples without normal distribution. For multiple comparisons, Kruskal-Wallis with post hoc was used, with the significance values adjusted by Bonferroni correction. Finally, for the analysis of microRNAs, the normal distribution of the data was verified by the Shapiro-Wilk test. Differences in quantitative data were analyzed using Student's T-test, where differences in the expression profiles of each miRNA candidate were compared with the mean of the control group. These values were measured with mean  $\pm$  standard deviation. Spearman's correlation was used to analyze the correlation of miRNA levels with severity scores and disease modulators. Univariate and multivariate logistic regression analyses were performed to evaluate the predictive value of the miRNA level for severity. The Receiver Operating Characteristic (ROC) curve was used to assess the diagnostic and prognostic value for severity. For this purpose, SPSS software version 26.0 (SPSS, Chicago, IL) was used. The significance level was set at  $p < 0,05$  and 95% power.

Laboratory values were categorized based on the standard reference values of the general population and values observed in the population with sickle cell anemia.

The initial severity score was calculated from a previous study, in which a disease severity score calculator is available, using 25 variables already described in the literature as modulators of disease severity according to the contribution of each in severity and relationship with the pathophysiology of the disease. Subsequently, severity was assessed by 97 variables, including the association of the genotype-phenotype of variants in the main HbF modifiers and their association with risk of death in these patients and compared with the initial severity score of the calculator.

Using predictors of severity previously identified and our analysis, we developed a phenotypic stratification with consequent clinical severity in SCA. Our study analyzed which criteria should be used to stratify sickle cell anemia into mild and severe according to the disease state and potential clinical utility that supports decision-making, but which may also be used in the future as a tool for predicting severity in these patients.

At the end, we provide a stratification table with a set of biomarkers conditioned to the severity of the disease and the probability of the occurrence of events associated with the clinical, laboratory, genetic, post-transcriptional regulation, and inflammatory mediators. Such

a tool presents a severity score, classifying the risks that vary from mild to severe, in addition to the risks of complications.

Hematological factors have been described as prognostic biomarkers in the clinical course of the disease. Therefore, those already consolidated in clinical practice and studies were included in our classification system: Total Hb, reticulocytes, leukocytosis in the absence of infections, HbF, Total bilirubin, LDH, and Platelets.

These individuals may present similar data for hematological and biochemical markers; however, they develop different evolutions over a period of time. Given this, the importance of a multifactorial stratification that encompasses genetic variables and inflammatory modulators is reinforced. As far as we know, this is the first work that explores an attempt at multifactorial stratification to develop a prognostic tool and potential clinical utility for this pathology.

## RESULTS

The average follow-up period for these patients was 31,8 years. Of the 197 HbSS individuals included in our cohort, 54,5% were female. In our population, 12,1% had strokes, 18,2% bone necrosis, 15,2% leg ulcers, 83,3% pain crises, 5,3% sepsis, 5,3% ACS, 6,8% pulmonary hypertension, 9,8% splenomegaly (developed in these patients at an average age of 1,9 years), 43,9% infections, 3% developmental delay, 2,3% pancreatitis, 14,4% cholelithiasis, 5,3% hepatosplenomegaly, 3% seizures and 75,1% developed up to 3 complications, while 24,9% had more than 3 complications (Table 1). The laboratory characteristics are shown in table 2.

Table 1. Clinical characteristics of the patients

Clinical manifestations	Yes	No
Stroke	16 (12,1%)	116 (87,9%)
Bone Necrosis	24 (18,2%)	108 (81,8%)
Leg Ulcers	20 (15,2%)	112 (84,8%)
Pain crises	110 (83,3%)	20 (15,21%)
Sepsis	7 (5,3%)	125 (94,7%)
Pulmonary Hypertension	9 (6,8%)	123 (93,2%)

Splenomegaly	13 (9,8%)	119 (90,2%)
Infections	58 (43,9%)	74 (56,1%)
Developmental Delay	4 (3%)	129 (97,7%)
Pancreatitis	3 (2,3%)	129 (97,7%)
Hepatosplenomegaly	6 (4,5%)	126 (95,5%)
Cholelithiasis	113 (85,6%)	19 (14,4%)
Seizures	4 (3,0%)	128 (97,0%)
Cardiomegaly	6 (4,5%)	126 (95,5%)
<= 3 complications	99 (75%)	x
>3 complications	33 (25%)	x

Table 2. Laboratory characteristics of the HbSS patients included in the study.

	N	Minimum	Maximum	Mean	Standard deviation
Age	132	7	73	31,89	15,994
TGO	132	14	98	39,10	16,12
TGP	132	8	129	25,44	17,86
Bilirubin	132	0,5	7,1	2,214	1,30
Urea	132	7	119	23,43	13,22
Creatinine	132	0,30	1,72	0,49	0,23
Hb	132	4,9	12,9	8,39	1,53
HbF	132	1,4	41,3	18,51	8,74
LDH	132	272	2200	861,78	398,59
VCM	132	68,8	133,9	95,37	13,09
Platelets	132	116	1282	373,28	169,42
Reticulocytes	132	2	31	11,01	5,92
Leukocytes	132	3,44	27,45	9,97	4,60

Note. The data values are expressed as an mean. TGO = glutamic-oxalacetic transaminase; TGP = glutamic-pyruvic transaminase; Hb = hemoglobin; Hb F = fetal hemoglobin; LDH = lactate dehydrogenase; MCV = Average corpuscular volume.

Our analyses of genetic polymorphisms in Xmn1-HBG2, BCL11A, and HBS1L-MYB concluded that 2 of these loci have a possible genetic relationship with specific clinical manifestations and levels of HbF distribution. Moreover, the presence of specific alleles may

attribute increasing risks of clinical complications according to the manifestation of the allele in the genotype, replicating some associations previously reported (Table 3).

Table 3. Genetic polymorphisms in Xmn1-HBG2, BCL11A and HBS1L-MYB and their association with HbF distribution levels, certain clinical manifestations and disease severity.

Locis	↑ HbF	↓ HbF	Association with risk of occurrence
BCL11A - rs1427407	T allele presence	G allele presence	Leg ulcers = TT
BCL11A - rs4671393	A allele presence	G allele presence	x
BCL11A - rs11886868	C allele presence	T allele presence	Splenomegaly = TT e STA = CC
HBS1L-MYB - rs9399137	C allele presence	T allele presence	Stroke = TT
HBS1L-MYB - rs9402686	A allele presence	G allele presence	Stroke = GG

When investigating the potential predictive value of microRNA expression in assessing SCA's severity and phenotypic heterogeneity, we revealed 3 microRNAs differentially expressed compared to individuals without the pathology. This fact suggests that increased or decreased levels of these microRNAs may outline a profile of modifying determinants and correlates of disease severity.

Later, when we explored the association of severity scores with the expression of each microRNA, we found significant correlations. In addition, the ROC (Receiver Operating Characteristic) curve showed that two of the microRNAs are possible efficient predictors and have potential clinical utility in phenotypic heterogeneity and clinical severity of the disease (Table 4).

Table 4. Micromnas expression and its association with disease severity.

Micromnas	Expression in relation to HbAA	Expression and severity scores	Diagnostic value for severity
Hsa-mir-15a	↓ (p < 0,001)	Significant negative correlation (p=0,007)	Great predictive value (AUC = 0,809-95% - p=0,014)
Hsa-mir-223	↑ (p < 0,001)	Significant positive correlation (p=0,003)	Great predictive value (AUC = 0,831-95% - p=0,009)
Hsa-mir-210	↑ (p = 0,001)	No significant correlation	x
Hsa-Mir-144	No statistical difference (p=0,343)	No significant correlation	x

When cytokine levels were analyzed, the data showed that individuals with HbSS had an overall increase in most inflammatory markers compared to HbAA individuals. When investigating the associations with severity scores and clinicopathological aspects, we found that systemic levels of these molecules are associated with variability in the degree of severity of the disease. Our results showed statistically significant differences in patients with a more severe profile than those with a milder clinical profile. When assessing the role of these inflammatory mediators in the development of clinical sub-phenotypes, there was a significant correlation between IL-10 and the development of bone necrosis ( $p = 0,006$ ), an association of IL-17 with pain crises was also observed ( $p = 0,041$ ), IL-4 to pancreatitis events ( $p = 0,048$ ) and IL-8 with cardiomegaly ( $0,047$ ) (Table 5).

Table 5. Association of inflammatory mediators with the clinical course and phenotypic diversity in AF.

Cytokines	Expression in relation to HbAA	Association with degree of severity (MILD/SEVERITY)	Predisposition to clinical events
FGF (pg/mL)	↑ ( $p = 0,938$ )	( $p = 0,027$ )	x
IL-1B (pg/mL)	↑ ( $p = 0,043^*$ )	( $p = 0,022$ )	x
G-CSF (pg/mL)	↓ ( $p = 0,807$ )	( $p = 0,002^*$ )	x
IL-10 (pg/mL)	↑ ( $p = 0,049^*$ )	( $p = 0,064$ )	Lower concentration = bone necrosis
IL-13 (pg/mL)	↓ ( $p = 0,112$ )	( $p = 0,002^*$ )	x
IL-6 (pg/mL)	↑ ( $p = 0,023^*$ )	( $p = 0,088$ )	x
IL-12 (pg/mL)	↑ ( $p = 0,076$ )	( $p = 0,391$ )	x
EOTAXIN (pg/mL)	↓ ( $p = 0,610$ )	( $p = 0,100$ )	x
IL-17 (pg/mL)	↓ ( $p = 0,227$ )	( $p = 0,528$ )	High concentration = pain crisis
MIP-1A (pg/mL)	↓ ( $p = 0,360$ )	( $p = 0,003^*$ )	x
MIP-1B (pg/mL)	↑ ( $p = 0,225$ )	( $p = 0,007^*$ )	x
MCP-1 (pg/mL)	↓ ( $p = 0,041^*$ )	( $p = 0,005^*$ )	x
IL-15 (pg/mL)	↓ ( $p = 0,208$ )	( $p = 0,007^*$ )	x
EGF (pg/mL)	↑ ( $p = 0,366$ )	( $p = 0,004^*$ )	x
IL-5 (pg/mL)	↓ ( $p = 0,210$ )	( $p = 0,009^*$ )	x
HGF (pg/mL)	↑ ( $p = 0,008^*$ )	( $p = 0,013^*$ )	x
VEGF (pg/mL)	↓ ( $p = 0,561$ )	( $p = 0,003^*$ )	x
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	↓ ( $p = 0,156$ )	( $p = 0,005^*$ )	x
IFN-a (pg/mL)	↓ ( $p = 0,032^*$ )	( $p = 0,004^*$ )	x

IL-1RA (pg/mL)	↑ (p = 0,686)	(p = 0,007*)	x
TNF-a (pg/mL)	↓ (p = 0,249)	(p = 0,005*)	x
IL-2 (pg/mL)	↑ (p = 0,300)	(p = 0,008*)	x
IL-7 (pg/mL)	↓ (p = 0,091)	(p = 0,005*)	x
IP-10 (pg/mL)	↑ (p = 0,346)	(p = 0,025*)	x
IL2-R (pg/mL)	↑ (p = 0,084)	(p = 0,100)	x
MIG (pg/mL)	↑ (p = 0,249)	(p = 0,081)	x
IL-4 (pg/mL)	↑ (P = 0,335)	(p = 0,102)	High concentration = pancreatitis
IL-8 (pg/mL)	↑ (p = 0,492)	(p = 0,010*)	High concentration = Cardiomegaly

Thus, using data from modulators already well established in the literature (1–3) together with our analyses, we established a phenotypic stratification of severity and the probability of developing events that characterize phenotypic heterogeneity in the disease (Table 6).

Our stratification results were consistent with the existing literature, where patients classified with a more severe profile, with a higher risk factor for mortality, demonstrated a worse clinical outcome. As far as we know, this is a pioneering study of a stratification system using hemoglobin genotypes, post-transcriptional regulation, inflammatory profile, and patient's clinical characteristics.

Table 6. Stratification of the phenotypic profile

Feature	Mild	Severity
HbF	>3%	<3%
α-thalassemia	yes	No
Reticulocytes	<5%	>13%
Hb	>8,0 g/dl	<8,0 g/dl
LDH	<225 UI/L	>225 UI/L
Bilirubi	<3,5 umol/ml	>3,5 umol/ml
TGO	<40	>100
TGP	<36	>100
Platelets	<400.000	>400.000
Sepsis	No	Yes
Chronic pain	No	Yes
Leukocytosis (absence of infection)	<15000	>15000
Hsa-mir-15a	↑	↓
Hsa-mir-223	↓	↑
BCL11A - rs1427407	T allele presence	G allele presence
BCL11A - rs4671393	A allele presence	G allele presence

BCL11A - rs11886868	C allele presence	T allele presence
HBS1L-MYB - rs9399137	C allele presence	T allele presence
HBS1L-MYB - rs9402686	A allele presence	G allele presence
FGF (mean pg/mL)	↑ (13,51)	↓ (11,40)
IL-1B (mean pg/mL)	↑ (7,77)	↓ (5,80)
G-CSF (mean pg/mL)	↓ (117,13)	↑ (138,22)
IL-10 (mean pg/mL)	↓ (17,44)	↑ (47,41)
IL-13 (mean pg/mL)	↓ (14,66)	↑ (19,06)
IL-6 (mean pg/mL)	↑ (7,18)	↓ (6,82)
IL-12 (mean pg/mL)	↓ (124,45)	↑ (163,57)
EOTAXIN (mean pg/mL)	↓ (39,41)	↑ (137,05)
IL-17 (mean pg/mL)	↑ (16,72)	↓ (6,76)
MIP-1A (mean pg/mL)	↓ (34,96)	↑ (39,17)
MIP-1B (mean pg/mL)	↑ (63,63)	↓ (59,42)
MCP-1 (mean pg/mL)	↑ (167,78)	↓ (130,97)
IL-15 (mean pg/mL)	↑ (59,21)	↓ (50,15)
EGF (mean pg/mL)	↑ (12,61)	↓ (10,86)
IL-5 (mean pg/mL)	↓ (6,11)	↑ (10,47)
HGF (mean pg/mL)	↓ (211,42)	↑ (237,63)
VEGF (mean pg/mL)	↓ (4,40)	↑ (7,71)
IFN- $\gamma$ (mean pg/mL)	↑ (19,06)	↓ (18,69)
IFN- $\alpha$ (mean pg/mL)	↑ (24,74)	↓ (21,04)
IL-1RA (mean pg/mL)	↑ (82,61)	↓ (72,02)
TNF- $\alpha$ (mean pg/mL)	↓ (6,08)	↑ (8,55)
IL-2 (mean pg/mL)	↑ (3,72)	↓ (3,37)
IL-7 (mean pg/mL)	↓ (7,81)	↑ (11,88)
IP-10 (mean pg/mL)	↓ (24,84)	↑ (38,81)
IL2-R (mean pg/mL)	↓ (171,20)	↑ (265,89)
MIG (mean pg/mL)	↓ (96,98)	↑ (321,77)
IL-4 (mean pg/mL)	↑ (16,46)	↓ (13,96)
IL-8 (mean pg/mL)	↓ (7,90)	↑ (180,20)

## DISCUSSION

Although SCA is characterized as a monogenic disease, the great clinical variability is a strong characteristic of this illness. Hypothesized as a multifactorial disease, it is already known that genetic variations, including polymorphisms in several genetic modifiers, such as in the HbF gene and several others that regulate the inflammatory response, modulate the clinical course of the disease (4–7).

Currently, severity modulators for the disease are known. Variables such as  $\alpha$ -thalassemia, HbF, laboratory indexes, and age have been discussed extensively and estimated as biomarkers of severity; however, in isolation, they become insufficient for diagnostic



purposes (8,9). An association of risk factors already established together with studies of genetic association that make it possible to link genetic polymorphisms with disease sub-phenotypes can provide prediction methods, with a more accurate prognosis and with the possibility of more individualized therapy, avoiding unnecessary interventions (8).

Small post-transcriptional regulators (microRNAs) have been explored and presented as essential for several cellular processes, regulating a range of target genes (10,11). In addition, SCA is a disease characterized by acute and chronic inflammation. Both vaso-occlusive and hemolysis manifestations are associated with inflammatory events with cytokine production and inflammatory mediators studied as potential modifiers and influencers of the SCA pathogenesis (12,13). In this context, our study demonstrated the possible pathophysiological consequences of certain risk factors in this population. We propose a model with a composite measure that includes polymorphisms in the gene of the main established modulator of SCA severity (HbF), the influence of post-transcriptional regulators, and inflammatory markers.

Sickle cell anemia classification systems have been the focus of some research. However, without a multifactorial approach, these systems can hide several fundamental factors in variations in the severity of the disease. Developing and evaluating a severity index for sickle cell anemia is an old challenge. Cameron *et al.* (1983), with a study focused on the patient's clinical presentation spectrum with a subsequent comparison with quantitative indices such as age at diagnosis, the number of hospitalizations, number, and types of crises, presence or absence of pneumococcal infection, organ involvement and growth deficiency, developed a model that would allow an assessment of severity (14). Several studies have investigated the relationship between hematological and biochemical parameters with the clinical severity of SCA (4,15–19); others used only rates of pain crisis to assess the severity of the disease (20–22).

More recently, a system composed of few patient characteristics, obtained during a clinical visit, was developed by Shah *et al.* (2020), using a modified Delphi system (RAND / UCLA) in the development of a severity system (23). Another analysis model proposed was the Bayesian network modeling, where 25 clinical events and laboratory tests were used to estimate the severity of sickle cell disease (24). The CSSCD (Cooperative Study of Sickle Cell Disease) was the first group to seek a broader model of the outcome of clinical severity for the disease. However, the classification did not address genetic factors that are likely to modulate the

variables and clinical events analyzed. Most genotype-phenotype association studies do not address laboratory aspects of the disease for a multifactorial understanding and measure of the disease. Given this context, several determinants, modifiers, and markers of disease severity have been the subject of studies in isolation (25). Integrating various variables that predict severity, developing and validating a composite measure has been a challenge. Furthermore, because of this gap, the need for a multifactorial analysis aimed at phenotype and severity may elucidate and lead to important discoveries of association.

Among the already established predictors of SCA complications is HbF, the best-studied genetic modulator to date, but the variation between individuals with the same pathology remains unclear, making it insufficient to predict severity. In addition, fetal hemoglobin expression is dependent on genetic regulation that involves numerous interactions, such as transcriptional regulation and polymorphisms in the genes that regulate it (26–28). The  $\alpha$ -thalassemia is another established predictor, which despite reducing HbS concentration and consequent polymerization, clinically seems to have an effect only on complications related to hemolysis, still presenting an increased risk of complications of the vaso-occlusive sub-phenotype (8,29).

Several other potential predictors seem to act independently, in addition to the polymerization caused by HbS and the presence of  $\alpha$ -thalassemia. In this context, there are new variants to be studied and the need for a composite analysis of the interaction of these factors in the disease's pathophysiology.

In our indexes, the incidence of clinical events was scored cumulatively over these patients' lives until the time of data collection, unlike other studies, which maintained the incidence for only a period, usually 1 to 2 years. In addition, our collections of biological material occurred in a stable clinical situation and with the exclusion of pre-existing factors or situations that could lead to some interference, such as blood transfusions. The use of HU in our population may have masked association by decreasing the incidence of vaso-occlusive crises. However, to minimize this confounding factor, the entire population studied was standardized with HU for at least 6 months. Since HU has been the recommended therapy for a better quality of life for this population, a study that evaluated hematological and biochemical indexes without using it could not be applicable as a good prognostic tool in a population that uses this therapy, showing the importance of an index that can meet the current scenario of these individuals.

More extensive multicenter longitudinal studies and mainly of clinical applicability are needed to confirm our hypotheses in addition to validating the potential for clinical utility of the model, its limitations, and whether it can lead to benefits from early therapies. For this, it is necessary to validate in independent cohorts. Thus, validating the predictive value and reliability of these data may lead to a possible identification of high-risk SCA patients with a potential for clinical utility in individualizing treatment.

Our model suggests that these would be promising biomarkers in determining SCA's etiological specificity. In addition, the stratification of such markers has been shown to predict the severity of the disease. Using these markers as a prognostic tool can reveal which patients would present a more severe profile with a high risk for certain events, which could lead to benefits in preventing certain clinical manifestations with targeted and individualized interventions.

## CONCLUSION

Our work revealed an association of possible biomarkers also associated with clinical events and disease severity. We show that multivariate analysis can lead to prognostic values of these biomarkers in predicting morbidity and mortality in SCA. It also demonstrates the importance of an interrelated analysis to understand the complex pathophysiology of the disease. Our stratification showed that to understand the phenotypic heterogeneity of the disease, identifying and associating a set of data may elucidate the interrelated pathological mechanisms, such as hemolysis, inflammation, oxidative stress, and vessel-occlusion. It was found, mainly, that each biomarker can be related or directly influence the other. However, they provide essential information about the physiology of the disease; in isolation, they could have a limited clinical value in the management of complications and severity of the disease.

## DECLARATION OF CONFLICTS OF INTERESTS

The author (s) have declared no potential conflict of interest concerning the research, authorship and/or publication of this article.

## REFERENCES

1. Sebastiani P, Nolan VG, Baldwin CT, Abad-Grau MM, Wang L, Adewoye AH, et al. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. *Blood*. 2007;110(7):2727–35.
2. Gary PH, JBM, SCT et al. Mortality in sickle cell disease - Life expectancy and risk factors for early death. *New English J Med*. 1990;323(16):1120–3.
3. Tweel XW van den, Lee JH van der, Howard J, Fijnvandraat K. Measuring complications of sickle cell disease: a systematic review. In: UvA-DARE (Digital Academic Repository). 2009. p. 41–53.
4. Kalpatthi R, Novelli EM. Measuring success: Utility of biomarkers in sickle cell disease clinical trials and care. *Hematol (United States)*. 2018;2018(1):482–92.
5. Nagel RL, Steinberg MH. Role of epistatic (modifier) genes in the modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. *Pediatr Pathol Mol Med*. 2001;112:93–112.
6. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2017;376(16):1561–73.
7. Fertrin KY, Costa FF. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: Implications for clinical diversity and treatment. *Expert Rev Hematol*. 2010;3(4):443–58.
8. Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2005;129(4):465–81.
9. Habara A, Steinberg MH. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. *Exp Biol Med*. 2016;241(7):689–96.
10. Barron N. *MicroRNAs as Tools in Biopharmaceutical Production*. 1st ed. Glasnevin, Dublin; 2012. 124 p.
11. Byon JCH, Papayannopoulou T. MicroRNAs: Allies or Foes in erythropoiesis? *J Cell Physiol*. 2012;227(1):7–13.
12. Carvalho MOS, Araujo-Santos T, Reis JHO, Rocha LC, Cerqueira BA V., Luz NF, et al. Inflammatory mediators in sickle cell anaemia highlight the difference between steady state and crisis in paediatric patients. *Br J Haematol*. 2018;182(6):933–6.
13. Barbu EA, Mendelsohn L, Samsel L, Thein SL. Pro-inflammatory cytokines associate with NETosis during sickle cell vaso-occlusive crises. *Cytokine [Internet]*. 2020;127(July 2019):154933. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154933>
14. Cameron BF, Christian E, Lobel JS, Gaston MH. Evaluation of clinical severity in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc*. 1983;75(5):483–7.
15. Da Guarda CC, Yahouédéhou SCMA, Santiago RP, Fernandes CFDL, Neres JSDS, Oliveira AMDJ, et al. Investigation of Lipid Profile and Clinical Manifestations in SCA Children. *Dis Markers*. 2020;2020.

16. Teixeira RS, Terse-Ramos R, Ferreira TA, Machado VR, Perdiz MI, Lyra IM, et al. Associations between endothelial dysfunction and clinical and laboratory parameters in children and adolescents with sickle cell anemia. *PLoS One*. 2017;12(9):1–14.
17. Nouraie M, Ashley-Koch AE, Garrett ME, Sritharan N, Zhang Y, Little J, et al. Serum albumin is independently associated with higher mortality in adult sickle cell patients: Results of three independent cohorts. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(8 July):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0237543>
18. Brousse V, El Hoss S, Bouazza N, Arnaud C, Bernaudin F, Pellegrino B, et al. Prognostic factors of disease severity in infants with sickle cell anemia: A comprehensive longitudinal cohort study. *Am J Hematol*. 2018;93(11):1411–9.
19. Garadah TS, Jaradat AA, AlAlawi ME, Hassan AB, Sequeira RP. Pain frequency, severity and QT dispersion in adult patients with sickle cell anemia: Correlation with inflammatory markers. *J Blood Med*. 2016;7:255–61.
20. Darbari DS, Brandow AM. Pain-measurement tools in sickle cell disease: Where are we now? *Hematology*. 2017;2017(1):534–41.
21. Darbari DS, Onyekwere O, Nouraie M, Minniti CP, Luchtman-Jones L, Rana S, et al. Markers of severe vaso-occlusive painful episode frequency in children and adolescents with sickle cell anemia. *J Pediatr*. 2011;23(1):1–7.
22. Nebor D, Bowers A, Hardy-Dessources MD, Knight-Madden J, Romana M, Reid H, et al. Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympatho-vagal balance, blood viscosity and inflammation. *Haematologica*. 2011;96(11):1589–94.
23. Shah N, Beenhouwer D, Broder MS, Bronte-Hall L, De Castro LM, Gibbs SN, et al. Development of a severity classification system for sickle cell disease. *Clin Outcomes Res*. 2020;12:625–33.
24. Sebastiani P, Nolan VG, Baldwin CT, Abad-grau MM, Wang L, Adewoye AH, et al. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. *Blood J*. 2016;110(7):2727–36.
25. Quinn CT. Minireview: Clinical severity in sickle cell disease: the challenges of definition and prognostication. *Exp Biol Med*. 2016;241(7):679–88.
26. Papisavva PL, Papaioannou NY, Patsali P, Kurita R, Nakamura Y, Sitarou M, et al. Distinct mirna signatures and networks discern fetal from adult erythroid differentiation and primary from immortalized erythroid cells. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7):1–29.
27. Verma HK, Ratre YK, Bhaskar LVKS, Colombatti R. Erythrocyte microRNAs: a tiny magic bullet with great potential for sickle cell disease therapy. *Ann Hematol*. 2021;100:607–14.
28. Sales RR, Belisário AR, Faria G, Mendes F, Luizon MR, Viana MB. Functional polymorphisms of BCL11A and HBS1L-MYB genes affect both fetal hemoglobin level and clinical outcomes in a cohort of children with sickle cell anemia. *Ann Hematol*. 2020;99(7):1453–63.

29. Ballas SK, Connes P. Rheological properties of sickle erythrocytes in patients with sickle-cell anemia: The effect of hydroxyurea, fetal hemoglobin, and  $\alpha$ -thalassemia. *Eur J Haematol.* 2018;101(6):798–803.

## **10 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nosso trabalho revelou uma associação de possíveis biomarcadores associados a eventos clínicos e gravidade da doença. Mostramos que uma análise multivariada pode levar a valores de prognósticos destes biomarcadores na predição da morbimortalidade na AF. Demonstrando a importância de uma análise interrelacionada para compreensão da complexa fisiopatologia da doença. Nossa estratificação mostrou que para o entendimento da heterogeneidade fenotípica da doença, a identificação e associação de um conjunto de dados poderá elucidar os mecanismos patológicos interrelacionados, como hemólise, inflamação, estresse oxidativo e vaso-oclusão. E, que principalmente cada biomarcador pode estar relacionado ou ter influência direta uns com os outros, e apesar de fornecerem informações importantes sobre a fisiologia da doença, isoladamente poderiam apresentar um valor clínico limitado no manejo das complicações e gravidade da doença.

## **11 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Desde a descoberta da AF, diversos estudos tem descrito a associação de parâmetros biológicos com a gravidade da AF. O conhecimento atual é baseado em estudos pequenos de característica observacionais e de variáveis isoladas. Estudos longitudinais, multicêntricos e intervencionistas na prática clínica se fazem necessário para que através de uma estratificação fenotípica desta população se consiga responder e aplicar na pratica clinica questões como: critérios a serem usados na classificação a AF como leve, moderada ou grave; quais os melhores testes para determinação da etiologia da doença; se existem biomarcadores que possam prever com segurança a gravidade da doença; se um possível prognóstico direcionaria para individualização de terapias; se tais biomarcadores ou estratificação da gravidade poderiam levar a um benefício de prevenção ou maior atenção dos eventos clínicos e se é possível através desta estratificação identificar aqueles pacientes com maiores riscos de mortalidade.

Neste contexto, o desenvolvimento e validação de uma ferramenta de classificação para AF que pudesse ser implementada na rotina de um ambiente clínico, poderia ser testado quanto a real capacidade de prognóstico e previsão de resultados clínicos, além de definir uma categorização que pudesse auxiliar na tomada de decisão e que pudesse auxiliar como ferramenta na individualização do tratamento.

## **ANEXOS**

### **ANEXO A**

**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

**SERVIÇO DE HEMATOLOGIA CLÍNICA**

**LABORATÓRIO DE CULTURA E ANÁLISE MOLECULAR DE CÉLULAS HUMANAS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

**PACIENTES**

Prezado paciente,

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa: “Análise multifatorial dos moduladores da gravidade da anemia falciforme e a exploração racional dos parâmetros na estratificação do perfil fenotípico como ferramenta para predição da gravidade, potencial utilidade clínica e acessibilidade à terapia individualizada”, que irá investigar características genéticas responsáveis por uma variedade de manifestações e complicações clínicas na Anemia Falciforme.

Ainda não existem tratamentos específicos para AF. Os tratamentos disponíveis atualmente consistem no objetivo de amenizar as manifestações clínicas e reduzir o número de crises para que você tenha uma melhor qualidade de vida.

Este projeto de pesquisa pretende estudar os mecanismos que influenciam na gravidade desta doença, que permitirá através da estratificação dos perfis o desenvolvimento de novos tratamentos e possíveis abordagens terapêuticas de forma individualizada.

Os dados necessários para realização do projeto serão obtidos através de análise de prontuários e utilização de 2,5 ml de sangue da veia já coletados em projeto anterior sob o número 0100585.

O material coletado será utilizado para análise de parâmetros bioquímicos, hematológicos, genéticos e perfil inflamatório para fins de pesquisa no entendimento dos mecanismos da doença.

A participação no estudo não trará benefício direto ao participante, porém contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado e os resultados poderão auxiliar a realização de estudos futuros.



Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante também não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

As informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, garantido assim o anonimato das informações obtidas, reservando apenas ao paciente ou familiar o acesso às mesmas.

Ressaltando que sua participação é voluntária, você tem a liberdade de recusar ou retirar o consentimento em qualquer fase do estudo sem nenhum prejuízo para você.

Todas as dúvidas poderão ser esclarecidas antes e durante o curso da pesquisa, através do contato com o pesquisador (a) responsável: Dra. Lucia Silla – (51) 33598850 e Pesquisador (a) executor Ianaê Wilke – (51) 33598850 do serviço de Hematologia Clínica do HCPA.

Em caso de dúvida em relação ao conteúdo ético desta pesquisa, não hesite em contatar o Comitê de Ética e Pesquisa do HCPA – (51) 33597640, das 08h às 17h.

Este documento é fornecido em duas vias, sendo uma do paciente e outra do pesquisador.

Pelo presente Consentimento Pós-informação, declaro que li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Fui igualmente informado de receber esclarecimentos sobre a pesquisa a ser realizada, da liberdade de não participar do estudo, do anonimato e caráter confidencial das informações.

Concordo com o uso do material coletado para futuras pesquisas ( ) SIM ( ) Não

Nome do Participante: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do Responsável: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

(Se aplicável)

Nome do pesquisador: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Loca e Data: \_\_\_\_\_

ANEXO B  
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
SERVIÇO DE HEMATOLOGIA CLÍNICA  
LABORATÓRIO DE CULTURA E ANÁLISE MOLECULAR DE CÉLULAS HUMANAS  
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO  
CONTROLE

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa: “Análise multifatorial dos moduladores da gravidade da anemia falciforme e a exploração racional dos parâmetros na estratificação do perfil fenotípico como ferramenta para predição da gravidade, potencial utilidade clínica e acessibilidade à terapia individualizada”, que irá investigar características genéticas responsáveis por uma variedade de manifestações e complicações clínicas na Anemia Falciforme.

Ainda não existem tratamentos específicos para AF. Os tratamentos disponíveis atualmente consistem no objetivo de amenizar as manifestações clínicas e reduzir o número de crises para uma melhor qualidade de vida destes pacientes. Tal conhecimento permitirá estabelecer novos tratamentos e possíveis abordagens terapêuticas que ajam diretamente na fisiopatologia desta doença.

Para realização deste estudo é necessário comparar um grupo de pacientes que apresentam a característica estudada com um grupo de colaboradores que não apresenta esta característica. Você está sendo convidado então, a participar do grupo controle, ou seja, que não possui a doença em questão.

Os dados necessários para realização do projeto serão obtidos através de análise de prontuários e uma coleta de 2,5 ml de sangue da veia, neste caso, será utilizada uma alíquota do sangue doado. Procedimento que pode provocar um leve desconforto no momento da coleta, no local onde a agulha for introduzida. Poderá surgir neste local

uma área vermelha ou até mesmo roxa (hematoma) na pele, mas que também desaparecerá com o decorrer do tempo.

A participação no estudo não trará benefício direto ao participante, porém contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado e os resultados poderão auxiliar a realização de estudos futuros.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e o participante também não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

As informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do colaborador a todo momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, garantido assim o anonimato das informações obtidas, reservando apenas ao paciente o acesso às mesmas.

Ressaltando que sua participação é voluntária, você tem a liberdade de recusar ou retirar o consentimento em qualquer fase do estudo sem nenhum prejuízo para você.

Todas as dúvidas poderão ser esclarecidas antes e durante o curso da pesquisa, através do contato com o pesquisador (a) responsável: Dra. Lucia Silla – (51) 33598850 e Pesquisador (a) executor Ianaê Wilke – (51) 33598850 do serviço de Hematologia Clínica do HCPA.

Em caso de dúvida em relação ao conteúdo ético desta pesquisa, não hesite em contatar o Comitê de Ética e Pesquisa do HCPA – (51) 33597640, das 08h às 17h.

Este documento é fornecido em duas vias, sendo uma do paciente e outra do pesquisador.

Pelo presente Consentimento Pós-informação, declaro que li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Fui igualmente informado de receber esclarecimentos sobre a pesquisa a ser realizada, da liberdade de não participar do estudo, do anonimato e caráter confidencial das informações.

Nome do Participante: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do Responsável: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_  
(Se aplicável)

Nome do pesquisador: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Loca e Data: \_\_\_\_\_

