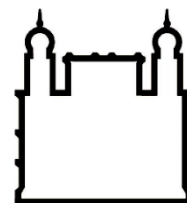




**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO, HEMATOLÓGICO E  
INFLAMATÓRIO EM CAMUNDONGOS FALCIFORMES: CORRELAÇÕES COM  
O METABOLISMO LIPÍDICO E PRODUÇÃO DE EICOSANOIDES EM MODELO  
DE ÚLCERA CUTÂNEA**

**GUSTAVO MARINHO MIRANDA**

**Salvador – Bahia  
2021**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental**

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO, HEMATOLÓGICO E  
INFLAMATÓRIO EM CAMUNDONGOS FALCIFORMES: CORRELAÇÕES COM  
O METABOLISMO LIPÍDICO E PRODUÇÃO DE EICOSANOIDES EM MODELO  
DE ÚLCERA CUTÂNEA**

**GUSTAVO MARINHO MIRANDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Jaime Ribeiro Filho

**Salvador – Bahia  
2021**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

**M672c** Miranda, Gustavo Marinho

Caracterização do perfil bioquímico, hematológico e inflamatório em camundongos falciformes: correlações com o metabolismo lipídico e produção de eicosanoides em modelo de úlcera cutânea/ Gustavo Marinho Miranda. \_ Salvador, 2021.

83f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Jaime Ribeiro Filho

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana e Experimental) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

1. Camundongos transgênicos. 2. Doença falciforme. 3. Eicosanoides. 4. Úlcera cutânea. I. Título.

CDU 616.15

**"CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO, HEMATOLÓGICO E INFLAMATÓRIO EM CAMUNDONGOS FALCIFORMES: CORRELAÇÕES COM O METABOLISMO LIPÍDICO E PRODUÇÃO DE EICOSANOIDES EM MODELO DE ÚLCERA CUTÂNEA".**

**Gustavo Marinho Miranda**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Salvador, 16 de dezembro de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dra. Patrícia Torres Bozza Viola  
Pesquisadora  
IOC/FIOCRUZ



---

Dra. Natália Machado Tavares  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



---

Dr. Jaime Ribeiro Filho  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

Programa de Excelência em Pesquisa nas Unidades Técnico-Científicas da Fiocruz - PROEP

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq

*Dedico este trabalho a minha família.  
É por vocês. É para vocês.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por possibilitar meu desenvolvimento pessoal e profissional, por me conceder força, coragem e sabedoria para superar todos os desafios e dificuldades da vida. Sem Ele, nada seria possível.

Ao meu amigo e orientador Dr. Jaime Ribeiro pela oportunidade de trabalharmos juntos, pela confiança depositada em mim e pelos ensinamentos partilhados durante esse tempo. Um exemplo de ser humano e profissional.

À minha mãe Damiana, meu pai Ailton e minha irmã “Debinha”, por terem me mostrado desde criança a importância do estudo e do conhecimento, pela confiança e pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Apesar da distância, sempre estiveram comigo.

Aos meus familiares, em especial vovó Iraci, que sempre acreditaram e torceram por mim.

Aos meus amigos do ensino médio, em especial Angélica, Tiago, Júlia, Davy, Alexandre e Jhuly; e aos meus amigos da graduação Jayane, Eduardo, Júnior, Cristielle e Talita, pelo apoio, companheirismo e incentivo. Vocês me mostraram que a distância não é problema quando a amizade é verdadeira.

À minha “co-ori” Sara, que me acompanha desde o início dos experimentos. Agradeço pela amizade, por todo incentivo, ensinamentos, auxílio, discussões, confiança e puxões de orelha. Gratidão por tudo.

Aos meus “irmãos” Kaio e Elaine e aos integrantes do JAIPHE, pelo acolhimento em Salvador, pela amizade, carinho, auxílio nos experimentos e convivência diária. Vocês fizeram com que minha mudança para cá se tornasse mais fácil.

Aos professores Dra Marilda Gonçalves, Dr. Vitor Fortuna, Dra. Natália Tavares, Dra. Nicole Regina e Dra. Patrícia Bozza, pela colaboração e contribuições.

À Brysa e Tiago, orientandos do prof. Vitor, pelo suporte, auxílio e colaboração no início dos experimentos.

Aos integrantes do LIGHT, em especial Modeste e a secretária Carol, pelas conversas, cafés e suporte.

Aos funcionários da Fiocruz Bahia e professores do PgPAT.

Ao CNPq e ao PROEP-IGM pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente com o presente trabalho.

MIRANDA, Gustavo Marinho. **Caracterização do perfil bioquímico, hematológico e inflamatório em camundongos falciformes**: correlações com o metabolismo lipídico e produção de eicosanoides em modelo de úlcera cutânea. 2021. 83 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana e Experimental) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A Anemia Falciforme é uma hemoglobinopatia autossômica recessiva, caracterizada pela mutação na sexta posição do gene da  $\beta$ -globina ( $GAG \rightarrow GTG$ ) que leva à substituição do ácido glutâmico por valina, gerando a hemoglobina S (HbS). Sua patogênese está relacionada com a polimerização da HbS, vaso-oclusão e inflamação estéril com posteriores complicações e alterações sistêmicas. As úlceras falciformes são complicações que afetam 8% a 10% dos pacientes com AF. Nesse contexto, embora seja estabelecido que a úlcera falciforme tanto resulte da predisposição dos pacientes, como induza processos inflamatórios, os mecanismos envolvidos, em particular, a participação dos mediadores lipídicos, permanecem por ser melhor investigados. **OBJETIVO:** Caracterizar o perfil hematológico, bioquímico e inflamatório de camundongos humanizados para anemia falciforme e avaliar as alterações locais e sistêmicas induzidas pela úlcera cutânea nestes animais. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Após anestesia, amostras de sangue total, soro, órgãos e fragmentos de pele de camundongos da linhagem Townes B6:129 foram coletados a fim de determinar as diferenças basais em parâmetros bioquímicos, hematológicos e inflamatórios de camundongos saudáveis (AA), com traço falciforme (AS) e com anemia falciforme (SS). No modelo murino de úlcera falciforme, quatro lesões cutâneas de 4 mm foram induzidas no dorso dos animais, e amostras destas lesões foram coletadas nos tempos de 0, 24 e 72h após a indução das úlceras. Nestes mesmos períodos de avaliação, amostras de sangue total foram destinadas à análise de hemograma e leucograma por análise semiautomatizada, utilizando equipamento URIT 5160 Vet e esfregaços sanguíneos corados com Romanowsky. Análises bioquímicas de colesterol total (CT), triglicerídeos, AST, ALT, ureia e creatinina realizada no soro, por espectrofotometria por método automatizado no equipamento Smart Vet 200+. As concentrações de  $PGE_2$  e  $LTB_4$  no soro foram avaliados por ELISA. A expressão de genes associados à produção de eicosanoides tais como COX-1, COX-2, 5-LO, PLA<sub>2</sub> e PLIN<sub>2</sub> nas lesões cutâneas foram determinadas por RT-qPCR. Análises histológicas do infiltrado inflamatório foram realizadas por microscopia em lâminas coradas por H&E, utilizando o programa *Imaje J 1.53*. As diferenças entre os grupos e respectivos



tempos foram avaliadas por pelos testes *One-way* ANOVA, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, utilizando o programa *Graphpad Prism* 8.0.2. **RESULTADOS:** A caracterização dos parâmetros basais mostrou que animais SS apresentaram anemia hemolítica grave e leucocitose, enquanto o grupo AS se assemelhou ao controle. Níveis elevados de AST foram observados nos grupos AS e SS em comparação ao grupo AA, enquanto ALT do grupo SS estava elevada em comparação com os grupos AA e AS, e os níveis de creatinina do grupo SS foram significativamente maiores que o grupo AA. No grupo SS a concentração sérica de PGE<sub>2</sub> se mostrou elevada enquanto os níveis de LTB<sub>4</sub> estavam diminuídos em comparação com os animais do grupo AA e AS. Correlações negativas entre hemoglobina, hemácias, hematócrito e PGE<sub>2</sub> foram observadas. As alterações induzidas pela úlcera no hemograma do grupo SS não foram significantes. No entanto, houve redução dos leucócitos totais em 24h e aumento em 72h nesse grupo. Em contrapartida, o infiltrado leucocitário tecidual apresentou aumento em 24h e leve redução em 72h. No grupo SS em 24h, houve redução de CT e de AST. Já em 72h, observamos aumento do CT e redução de ALT e creatinina no mesmo grupo. Ainda no grupo SS, o perfil de expressão da COX-2 no tecido aumentou em 72h, enquanto a PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> sistêmicos não apresentaram alterações significativas. **CONCLUSÃO:** Animais transgênicos com anemia falciforme apresentam alterações bioquímicas e hematológicas que estão correlacionadas a um desbalanço no metabolismo lipídico e produção de eicosanoides, contribuindo para um maior estado inflamatório em nível basal. A indução de úlcera cutânea neste modelo leva a um maior recrutamento de leucócitos nos animais doentes em comparação com os animais saudáveis e com traço falciforme, o que parece estar relacionado com as alterações bioquímicas, hematológicas e inflamatórias apresentadas por estes animais.

**Palavras-chave:** Camundongos transgênicos. Doença falciforme. Eicosanoides. Inflamação. Úlcera cutânea.

MIRANDA, Gustavo Marinho. **Characterization of the biochemical, hematological and inflammatory profile in sickle-cell mice:** correlations with lipid metabolism and eicosanoid production in a skin ulcer model. 2021. 83 f. Dissertation (Master Degree in Human and Experimental Pathology) - Federal University of Bahia, Faculty of Medicine, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Sickle Cell Anemia (SCA) is an autosomal recessive hemoglobinopathy characterized by the mutation in the sixth position of the  $\beta$ -globin gene ( $GAG \rightarrow GTG$ ) that leads to the replacement of glutamic acid by valine, generating hemoglobin S (HbS). Its pathogenesis involves HbS polymerization, vaso-occlusion and sterile inflammation with subsequent complications and systemic changes. Sickle cell ulcers are complications that affect 8% to 10% of SCA patients. While it is well-established that sickle cell ulcer both results from genetic predisposition and induces inflammatory processes, the mechanisms involved, in particular, the participation of lipid mediators, remain to be better investigated. **OBJECTIVE:** To characterize the hematological, biochemical, and inflammatory profile of transgenic sickle cell anemia mice and to evaluate the local and systemic alterations induced by cutaneous ulcer in these animals. **MATERIALS AND METHODS:** After anesthesia, samples of whole blood, serum, organs and skin fragments of Townes B6:129 mice were collected in order to determine the baseline differences in biochemical, hematological and inflammatory parameters of healthy (AA), sickle cell trait (AS) and sickle cell anemia (SS) mice. In the murine model of sickle cell ulcer, four 4 mm skin lesions were induced on the back of the animals, and samples of these lesions were collected at the time-points 0, 24 and 72 h after ulcer induction. In these same evaluation periods, whole blood samples were separated for blood counts and leukogram analysis by semi-automated analysis, using URIT 5160 Vet equipment and blood smears with the Romanowsky method. Biochemical analyses of total cholesterol (TC), triglycerides, AST, ALT, urea and creatinine were performed in the serum by spectrophotometry by automated method in a smart vet 200+ equipment. The concentrations of PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> in the serum were evaluated by ELISA. The expression of genes associated with the production of eicosanoids such as COX-1, COX-2, 5-LO, PLA<sub>2</sub> and PLIN<sub>2</sub> in skin lesions was determined by RT-qPCR. Histological analyses of inflammatory infiltrates in the skin were performed by optical microscopy using H&E-stained slides and quantifications were performed using the *Imaje J* program version 1.53. The differences between the groups and their respective time-points were evaluated by One-way ANOVA, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests, using the *Graphpad Prism* program version 8.0. **RESULTS:** The characterization of baseline parameters showed that SS animals presented severe hemolytic anemia and leukocytosis, while the AS group showed no significant differences compared to the control group. High levels of AST were observed in AS and SS animals, compared to the AA group, while ALT was found to be increased in the SS group compared to both AA and AS animals, and creatinine levels were increased in the SS group compared to the AA group. In the SS group, the levels of PGE<sub>2</sub> in the serum were increased while LTB<sub>4</sub> levels were decreased in comparison with AA and AS mice. Negative correlations between hemoglobin, red blood cells, hematocrit and PGE<sub>2</sub> were observed. The changes induced by the ulcer protocol in the blood counts of the SS group were not significant. However, we observed a reduction in total leukocytes within 24 h and an increase in 72 h in this group. On the other hand, the tissue leukocyte infiltrate increased in 24 h and a slight reduction in 72 h. In the SS group in 24 h, there was a reduction in total cholesterol (TC) and AST. In 72 h, we observed an increase in TC and a reduction of ALT and creatinine

in the same group. Also in the SS group, tissue COX-2 expression was increased in 72 h, while systemic PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> did not present significant alterations. **CONCLUSION:** Transgenic sickle cell anemia mice present biochemical and hematological alterations that are correlated with an imbalance in lipid metabolism and eicosanoid production, contributing to a greater inflammatory state at the basal level. The induction of skin ulcers in this model leads to greater leukocyte recruitment in sick animals compared to healthy and sickle cell trait animals, which seems to be related to the biochemical, hematological, and inflammatory changes presented by these animals.

**Keywords:** Eicosanoids. Inflammation. Sickle cell disease. Skin ulcer. Transgenic mouse.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Alterações genéticas da hemoglobina.....	21
<b>Figura 2:</b> Fisiopatologia da anemia falciforme.....	24
<b>Figura 3:</b> Mecanismos fisiopatológicos da úlcera falciforme.....	26
<b>Figura 4:</b> Metabolismo do ácido araquidônico pela via das ciclooxigenases.....	31
<b>Figura 5:</b> Metabolismo do ácido araquidônico pela via da 5-Lipoxigenase.....	32
<b>Figura 6:</b> Hemograma dos camundongos transgênicos com traço falciforme e anemia falciforme em estado basal comparados com os camundongos transgênicos sadios. ....	44
<b>Figura 7:</b> Leucograma dos camundongos transgênicos com traço falciforme e anemia falciforme em estado basal comparados com os camundongos transgênicos sadios .....	46
<b>Figura 8:</b> Dosagens bioquímicas dos camundongos transgênicos com traço falciforme e anemia falciforme em estado basal comparadas aos camundongos transgênicos sadios .....	47
<b>Figura 9:</b> Níveis sistêmicos de prostaglandina E <sub>2</sub> e leucotrieno B <sub>4</sub> de camundongos transgênicos com traço falciforme e anemia falciforme em estado basal comparadas aos camundongos transgênicos sadios .....	48
<b>Figura 10:</b> Expressão de enzimas relacionadas com a síntese de eicosanoides na pele camundongos transgênicos com anemia falciforme em estado basal comparadas aos camundongos transgênicos sadios .....	49
<b>Figura 11:</b> Peso relativo dos órgãos de camundongos transgênicos com traço falciforme e anemia falciforme em estado basal comparadas aos camundongos transgênicos sadios .....	51
<b>Figura 12:</b> Matriz de correlação entre os principais resultados da caracterização basal .....	52
<b>Figura 13:</b> Alterações do hemograma 24h e 72h após a indução da úlcera comparados aos valores basais.....	54
<b>Figura 14:</b> Leucograma dos camundongos com traço falciforme e anemia falciforme 24h após indução da úlcera comparados com os camundongos sadios .....	55
<b>Figura 15:</b> Leucograma dos camundongos com traço falciforme e anemia falciforme 72h após indução da úlcera comparados com os camundongos sadios .....	57
<b>Figura 16:</b> Alterações do leucograma 24h e 72h após a indução da úlcera comparadas aos valores basais.....	59
<b>Figura 17:</b> Alterações das dosagens bioquímicas 24h e 72h após a indução da úlcera comparadas aos valores basais .....	61

<b>Figura 18:</b> Alterações nos níveis sistêmicos de prostaglandina E <sub>2</sub> e leucotrieno B <sub>4</sub> após 24h e 72h da indução úlcera em camundongos com traço falciforme e anemia falciforme comparados com os camundongos sadios .....	62
<b>Figura 19:</b> Alterações na expressão de enzimas relacionadas com a síntese de eicosanoides no tecido da úlcera após 72h da indução em camundongos com anemia falciforme comparados com os camundongos sadios. ....	63
<b>Figura 20:</b> Infiltrado leucocitário na pele íntegra de camundongos com traço falciforme e anemia falciforme comparados com os camundongos sadios, comparados com o infiltrado de 24h e 72h após a indução da úlcera. ....	64
<b>Figura 21:</b> Cortes histológicos representativos do infiltrado leucocitário após 24h da indução da úlcera.....	65
<b>Figura 22:</b> Cortes histológicos representativos do infiltrado leucocitário após 72h da indução da úlcera.....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Lista de genes alvo, sua função e sequência dos primers utilizados. ....	40
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

12-LOX – 12-Lipoxigenase

15-LOX – 15-Lipoxigenase

5- HETE – 5- hidroxiéicosatetraenóico

5-HpETE – 5-hidroperoxiéicosatetraenóico

5-LOX – 5-Lipoxigenase

AA – Ácido araquidônico

AF – Anemia Falciforme

ALT – Alanina Aminotransferase

AST – Aspartato Aminotransferase

ATP – Adenosina Tri Fosfato

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BLT<sub>1</sub> – Receptor 1 do Leucotrieno B<sub>4</sub>

BLT<sub>2</sub> – Receptor 2 do Leucotrieno B<sub>4</sub>

cAMP – Adenosina Monofosfato Cíclico

cDNA – DNA complementar

CHCM – Concentração de Hemoglobina Média

COX – Ciclooxygenase

COX-1 – Ciclooxygenase 1

COX-2 – Ciclooxygenase 2

cPLA<sub>2</sub> – Fosfolipase A<sub>2</sub> citosólica

CysLT<sub>1</sub> – Receptor 1 de cisteionil-leucotrienos

CysLT<sub>2</sub> – Receptor 2 de cisteionil-leucotrienos

DAMP – Padrão Molecular Associado ao Dano (do inglês *Damage-Associated Molecular Pattern*)

DF – Doença Falciforme

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP<sub>1</sub> – Receptor 1 da Prostaglandina D<sub>2</sub>

DP<sub>2</sub> – Receptor 2 da Prostaglandina D<sub>2</sub>

EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

EET – Ácido epoxieicosatrienóico

EP<sub>1</sub> – Receptor 1 da Prostaglandina E<sub>2</sub>

EP<sub>2</sub> – Receptor 2 da Prostaglandina E<sub>2</sub>  
EP<sub>3</sub> – Receptor 3 da Prostaglandina E<sub>2</sub>  
EP<sub>4</sub> – Receptor 4 da Prostaglandina E<sub>2</sub>  
FP – Receptor de Prostaglandina F<sub>2α</sub>  
H&E – Hematoxilina e eosina  
Hb – Hemoglobina  
HbA – Hemoglobina A  
HbA<sub>2</sub> – Hemoglobina A<sub>2</sub>  
HbAS – Hemoglobina AS  
HbF – Hemoglobina Fetal  
HbS – Hemoglobina S  
HCM – Hemoglobina Corpuscular Média  
HDL – Lipoproteína de Alta Densidade  
ICAM-1 – Molécula de Adesão Intracelular 1  
IGM – Instituto Gonçalo Moniz  
IL – Interleucina  
IP – Receptor da Prostaciclina  
iPLA<sub>2</sub> – Fosfolipase A<sub>2</sub> independente de cálcio  
LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade  
LISTA DE SIGLAS  
LOX – Lipoxigenase  
LT – Leucotrieno  
LTA<sub>4</sub> – Leucotrieno A<sub>4</sub>  
LTB<sub>4</sub> – Leucotrieno B<sub>4</sub>  
LTC<sub>4</sub> – Leucotrieno C<sub>4</sub>  
LTD<sub>4</sub> – Leucotrieno D<sub>4</sub>  
LTE<sub>4</sub> – Leucotrieno E<sub>4</sub>  
LX – Lipoxina  
mRNA – RNA mensageiro  
NET – Rede Extracelular de Neutrófilo  
NO – Óxido Nítrico  
NOD – Receptor do tipo Nod  
PG – Prostaglandina  
PGD<sub>2</sub> – Prostaglandina D<sub>2</sub>



PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>

PGF<sub>2α</sub> – Prostaglandina F<sub>2α</sub>

PGG<sub>2</sub> – Prostaglandina G<sub>2</sub>

PGH<sub>2</sub> – Prostaglandina H<sub>2</sub>

PGI<sub>2</sub> – Prostaciclina

PLA<sub>2</sub> – Fosfolipase A<sub>2</sub>

PRR – Receptor de Reconhecimento Padrão

PUFA – Ácido Graxo Poliinsaturado (do inglês *Polyunsaturated fatty acids*)

RDW – Amplitude de Distribuição de Eritrócitos (do inglês *Red Cell Distribution Width*)

RNA – Ácido ribonucleico

sPLA<sub>2</sub> – Fosfolipase A<sub>2</sub> secretória

TLR – Receptor do tipo Toll (do inglês *Toll like receptor*)

TX – Receptor do Tromboxano A<sub>2</sub>

TXA<sub>2</sub> – Tromboxano A<sub>2</sub>

UFBA – Universidade Federal da Bahia

VCAM-1 – Molécula de Adesão Vascular 1

VCM – Volume Corpuscular Médio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1 ANEMIA FALCIFORME .....	20
1.1.1 <b>Fisiopatologia</b> .....	22
1.1.2 <b>Aspectos clínicos e complicações</b> .....	24
1.1.2.1 Úlcera falciforme .....	25
1.1.3 <b>Alterações laboratoriais na anemia falciforme</b> .....	27
1.2 INFLAMAÇÃO E ANEMIA FALCIFORME .....	28
1.2.1 <b>Eicosanoides e suas funções em doenças inflamatórias</b> .....	29
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	34
<b>3 HIPÓTESE</b> .....	<b>35</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	36
4.1 OBJETIVO GERAL .....	36
4.1.1 <b>Objetivos específicos</b> .....	36
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
5.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS .....	37
5.2 CARACTERIZAÇÃO BASAL .....	37
5.3 MODELO DE ÚLCERA CUTÂNEA .....	38
5.4 HEMOGRAMA E LEUCOGRAMA .....	38
5.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	39
5.6 PCR EM TEMPO REAL .....	39
5.6.1 <b>Extração de RNA</b> .....	39
5.6.2 <b>Síntese de cDNA</b> .....	40
5.6.3 <b>Expressão gênica</b> .....	40
5.7 DOSAGEM DE EICOSANOIDES .....	41
5.8 ANÁLISE DO INFILTRADO LEUCOCITÁRIO .....	41
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
<b>6 RESULTADOS</b> .....	43
6.1 CARACTERIZAÇÃO BASAL .....	43
6.1.1 <b>Hemograma</b> .....	43
6.1.2 <b>Leucograma</b> .....	45
6.1.3 <b>Dosagens bioquímicas</b> .....	47
6.1.4 <b>Quantificação de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> séricos</b> .....	48

6.1.5 Expressão de enzimas relacionadas com síntese de eicosanoides.....	49
6.1.6 Peso relativo dos órgãos .....	50
6.1.7 Correlação entre principais resultados .....	52
6.2 ALTERAÇÕES LOCAIS E SISTÊMICAS INDUZIDAS PELO MODELO DE ÚLCERA CUTÂNEA.....	53
6.2.1 Alterações no hemograma .....	53
6.2.2 Alterações no leucograma.....	54
6.2.3 Alterações nas dosagens bioquímicas .....	60
6.2.4 Alterações nos níveis séricos de PGE <sub>2</sub> e LTB <sub>4</sub> .....	62
6.2.5 Alterações na expressão de enzimas associadas à síntese de eicosanoides .....	62
6.2.6 Análise do infiltrado inflamatório.....	64
7 DISCUSSÃO .....	67
8 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS .....	73
ANEXOS .....	79
Anexo A: Artigo publicado .....	79
Anexo B: Artigo publicado .....	80
Anexo C: Apresentação de trabalho em evento científico.....	81
Anexo D: Certificado de aprovação do CEUA – Projeto 002/2020.....	82
Anexo E: Certificado de aprovação do CEUA – Projeto 021/2019.....	83

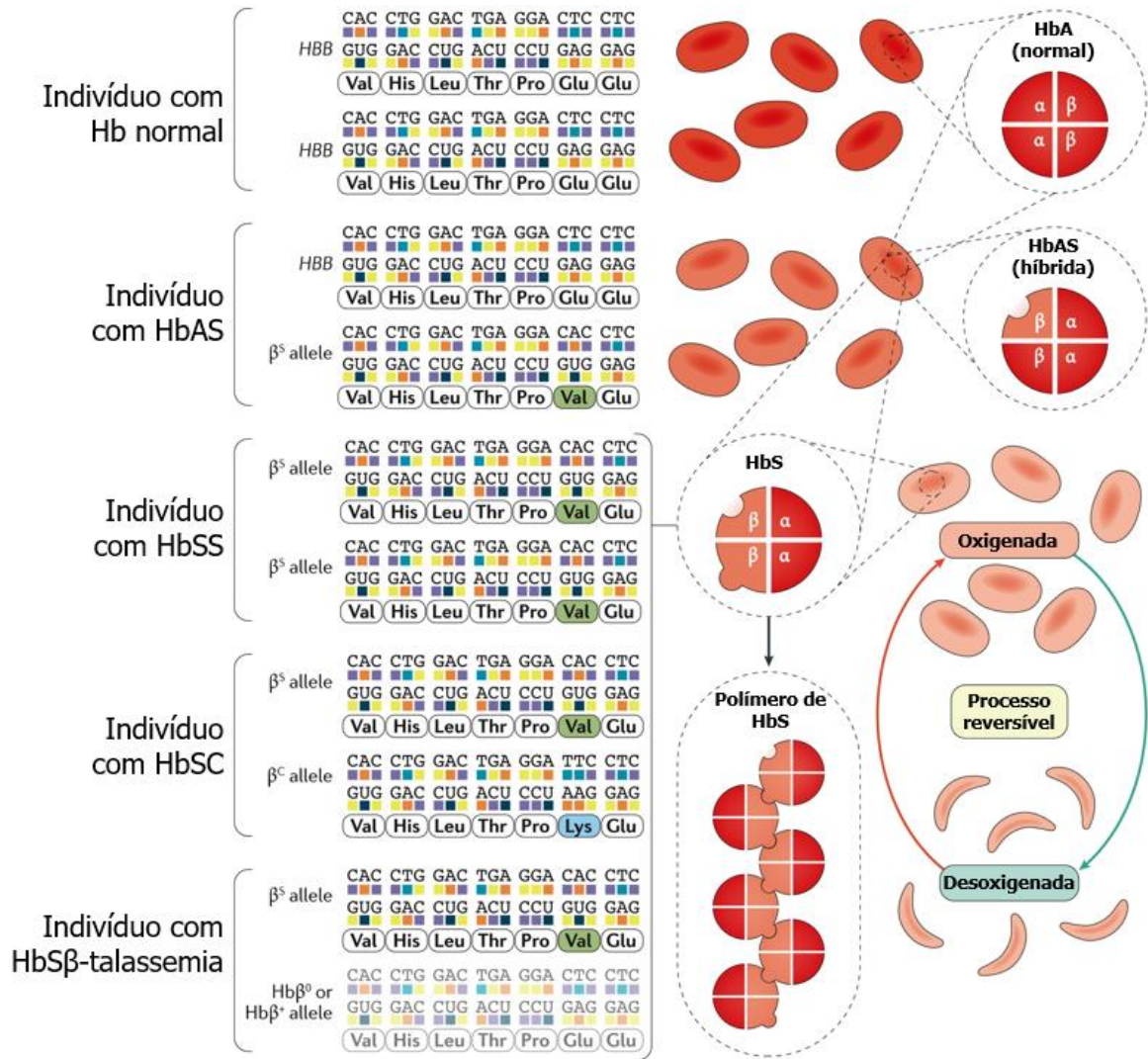
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ANEMIA FALCIFORME

As hemoglobinopatias são doenças que afetam a estrutura e a função da hemoglobina (Hb), a principal proteína presente nos eritrócitos, cuja função é a de transporte de oxigênio. Esta proteína é um tetrâmero e, a depender do tipo de hemoglobina, os seus dímeros podem se apresentar diferentes arranjos quanto às subunidades. A hemoglobina A (HbA), composta por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ , corresponde a 95% da Hb total nos adultos. Por outro lado, a hemoglobina A2 (HbA2), que é composta por duas subunidades  $\beta$  e duas subunidades  $\delta$ , apresenta concentração menor que 3,5% na corrente sanguínea. Por fim, a hemoglobina fetal (HbF) possui duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\gamma$  e sua concentração sanguínea é menor que 2% (IYER et al., 2015).

Dentre as hemoglobinopatias, destaca-se um grupo de patologias denominada doença falciforme (DF), que se caracterizam pela mutação do gene que codificam a subunidade  $\beta$  da hemoglobina. Estão incluídas nesse grupo de patologias a anemia falciforme (AF), doença da hemoglobina SC, doença da hemoglobina S- $\beta$ -talassemia, entre outras mutações mais raras (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

A AF é uma doença autossômica recessiva, causada pela homozigose do alelo  $\beta^S$  localizado no cromossomo 11, que se diferencia do alelo  $\beta$  selvagem pelo polimorfismo do sexto códon do gene da  $\beta$ -globina, onde a base nitrogenada adenina é substituída pela timina. Isso leva à substituição do aminoácido hidrofílico ácido glutâmico pelo aminoácido hidrofóbico valina na cadeia da  $\beta$ -globina, gerando a HbS ( $\alpha_2\beta^S_2$ ) (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2018). Os indivíduos que são heterozigotos para o alelo  $\beta^S$  são portadores do traço falciforme (hemoglobina híbrida HbAS), no entanto não é considerada uma DF (KATO et al., 2018).



**Figura 1** - Alterações genéticas da hemoglobina. A hemoglobina normal (HbA) é formada por duas subunidades  $\alpha$  e duas  $\beta$  codificadas pelo alelo HBB. A doença falciforme ocorre quando os dois alelos HBB são mutados e pelo menos um dele é  $\beta^S$ , resultando na substituição do ácido glutâmico por valina na posição 6 da cadeia da  $\beta$ -globina. Indivíduos com apenas um alelo  $\beta^S$  e um alelo HBB normal apresentam traço falciforme (HbAS).

**Fonte:** Adaptado de Kato et al. (2018).

A AF é considerada o distúrbio monogênico mais comum, com alta prevalência em países da África Subsaariana, da bacia do Mediterrâneo e do Oriente Médio. Estimativas recentes sugerem que mundialmente cerca de 300.000 crianças nascem com AF a cada ano, sendo a maioria desses nascimentos na Nigéria, República Democrática do Congo e Índia (PIEL et al., 2013; PIEL; STEINBERG; REES, 2017). No Estados Unidos, a população portadora da doença era de cerca de 100.000 pessoas em 2010 (HASSELL, 2010).

No Brasil, a distribuição de portadores da AF é bastante heterogênea. Uma vez que se supõe que introdução da doença no país foi feita ainda durante o tráfico de africanos para o Nordeste para trabalho escravo, essa região apresenta maior prevalência da doença (RUIZ,

2007). Segundo dados Ministério da Saúde (2012), a Bahia é o estado que possui maior incidência da doença no país, afetando 1 a cada 650 nascidos vivos, e em estados da região sul como Santa Catarina e Paraná ocorre uma menor incidência da doença, afetando 1 a cada 13.500 nascidos vivos. A incidência na região do Recôncavo Baiano é ainda maior que a média estadual, de 1:314 nascidos vivos (SILVA et al., 2016).

### 1.1.1 Fisiopatologia

A AF é caracterizada pela presença de hemácias em formato de foice no sangue periférico, cujas alterações morfológicas e funcionais levam ao desenvolvimento dos sinais e sintomas observados nos indivíduos com esta doença (PICCIN et al., 2019). Nas últimas décadas foram caracterizados quatro processos fisiopatológicos principais que estão envolvidos com o desenvolvimento das manifestações clínicas da AF: a polimerização da HbS, crises de vaso-oclusão, disfunção endotelial mediada por hemólise e a inflamação estéril (figura 2) (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2018).

O processo de polimerização é o evento primário da patogênese da doença, que resulta na distorção da forma da hemácia. Quando a hemoglobina S é desoxigenada, a presença do aminoácido hidrofóbico Valina favorece a interação com outra molécula de HbS adjacente, resultando na formação do polímero na hemácia (BUNN, 1997).

A concentração de hemoglobina intra-eritrocitária é o parâmetro mais sensível que influencia no grau de polimerização da hemácia, pois representa não só a quantidade de hemoglobina que podem interagir entre si, mas também a proximidade dessas moléculas (BARABINO; PLATT; KAUL, 2010). Além disso, essa taxa é inversamente proporcional à concentração de HbF na hemácia, uma vez que esta substitui a HbS e impede ou diminui a interação hidrofóbica (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Os eritrócitos falciformes possuem uma maior capacidade de aderirem às células do endotélio vascular, levando ao processo de vaso-oclusão (CHIANG; FRENETTE, 2005). Isso ocorre devido a uma maior expressão de moléculas de adesão como a molécula de adesão vascular (VCAM-1), molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), P-selectina e E-selectina. Essa expressão pode ser observada em pacientes em estado estável, e se acentua em episódios de crises de dor (ATAGA; KEY, 2007). Além disso, eritrócitos deformados podem ser sequestrados mecanicamente na microcirculação devido à sua forma, promovendo a vaso-oclusão (BUNN, 1997).

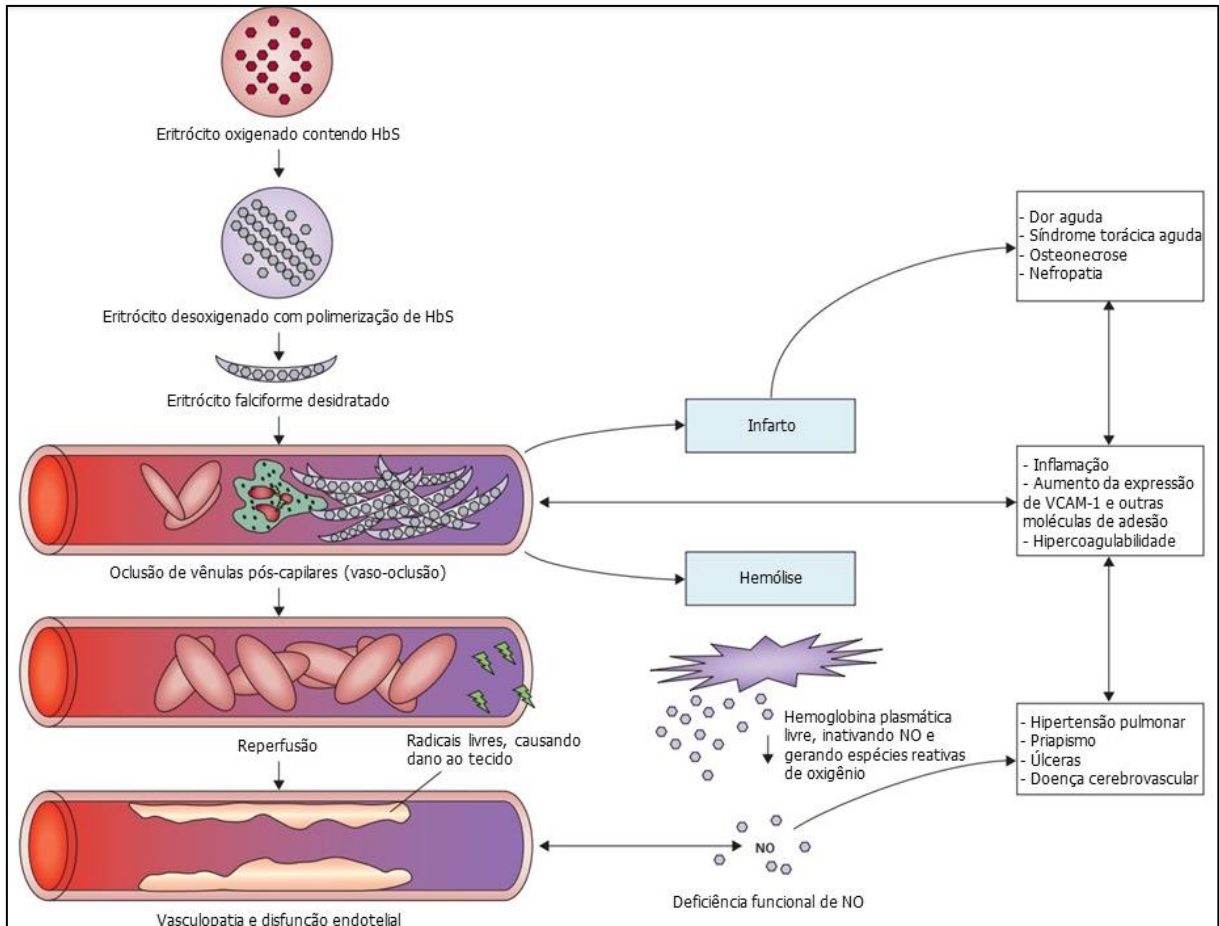
O fenômeno de vaso-oclusão também está relacionado com a adesão de leucócitos ao endotélio vascular (FRENETTE, 2002). Sabe-se que neutrófilos em pacientes com AF apresentam integrinas do tipo MAC-1 70% mais expressas, resultando numa maior capacidade de adesão com hemácias falcêmicas, levando à obstrução do fluxo sanguíneo e isquemia. Como consequência, há um aumento do trânsito dos eritrócitos que, uma vez desoxigenados, aumentam a polimerização e promovem ainda mais o processo vaso oclusivo (ZHANG et al., 2016).

Durante o processo de polimerização da HbS, ocorrem alterações diretas na bicamada fosfolipídica das hemácias, contribuindo para a apoptose precoce. Além disso, há aumento da permeabilidade, disfunções em canais de íons e exposição de moléculas como a fosfatidilserina na camada externa da membrana, que possui papel importante na ativação endotelial, no aumento da hemólise e na interação com outras hemácias (KATO et al., 2018).

As hemácias de indivíduos saudáveis possuem sobrevida estimada em 120 dias, enquanto hemácias com HbS têm sobrevida estimada em 17 dias. Essa diminuição do tempo de vida dos eritrócitos se dá devido à danos diretos da membrana ocasionados pela polimerização da hemoglobina, desidratação celular causada pelas alterações da permeabilidade e fagocitose das hemácias aprisionadas fisicamente na circulação (SCHNOG et al., 2004).

Durante os episódios de hemólise intravascular, diversos produtos são liberados na corrente sanguínea, como a arginase, que consome a arginina, a molécula precursora do óxido nítrico (NO), impedindo que o NO seja formado para gerar vasodilatação. Além disso, o próprio heme livre é considerado um mediador importante de lesões vasculares e inflamação por ser uma potente causa de estresse oxidativo, sendo reconhecido como um padrão molecular associado ao dano (DAMP) pelas células (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017).

O heme liberado pós-hemólise e sua forma oxidada, a hemina, são capazes de ativar receptores Toll-like 4 (TLR<sub>4</sub>), gerando um estado pró-inflamatório local caracterizado por leucócitos ativados, tempestade de citocinas, geração de espécies reativas de oxigênio e depleção de NO (KATO et al., 2018). Além disso, Chen et al. (2014) demonstraram que o heme promove a formação de redes extracelulares de neutrófilos (NETs), que relacionam-se diretamente com fenômenos de vaso-oclusão e inflamação.



**Figura 2** - Fisiopatologia da anemia falciforme. O eritrócito com HbS se polimeriza quando desoxigenado, alterando sua estrutura. A vaso-occlusão é resultante da ativação endotelial e da interação entre os eritrócitos falcêmicos e leucócitos, gerando infarto tecidual e hemólise, liberando mediadores que desencadeiam os processos inflamatórios. NO = óxido nítrico. VCAM = molécula de adesão celular vascular.

**Fonte:** Adaptado de Rees; Williams; Gladwin, (2010).

### 1.1.2 Aspectos clínicos e complicações

A AF é considerada uma doença sistêmica, uma vez que as manifestações clínicas são altamente heterogêneas e podem atingir diversos órgãos. Neste sentido, anemia hemolítica, crises de dor e problemas vasculares são as principais manifestações que os indivíduos apresentam (PINTO et al., 2019).

Em geral, as manifestações clínicas estão associadas aos episódios vaso-oclusivos. Nesse contexto, as crises de dor são as manifestações mais comuns apresentadas pelos portadores da AF, sendo que a gravidade e a frequência desses episódios são bastante variáveis, e essas crises estão inversamente relacionadas com os níveis de HbF dos pacientes e são as principais causas de hospitalização (STEINBERG, 2008).

A síndrome torácica aguda é a segunda maior causa de hospitalização e a maior causa de morte, e é caracterizada por sintomas respiratórios semelhantes à pneumonia como tosse,



dor e desconforto respiratório, acompanhado normalmente de febre. Todos esses sintomas estão relacionados com as características vasculares do pulmão que estão mais propícias à falcização e vaso-oclusão, e uma vez que os danos nos vasos pulmonares passam a ser recorrentes o indivíduo desenvolve alterações permanentes que levam à hipertensão pulmonar (GUALANDRO; FONSECA; GUALANDRO, 2007; STEINBERG, 2008).

O acometimento do fígado também é observado em indivíduos com XX. Os episódios agudos de hepatopatia geralmente são resultantes de uma isquemia secundária à falcização e vaso-oclusão, e já os casos mais crônicos estão relacionados com sobrecarga de ferro proveniente das transfusões múltiplas, e com as hemólises intensas que geram acúmulo de bilirrubina e formação de cálculos biliares, com consequente colestase (BORTOLOTTI et al., 2020; THEOCHARIDOU; SUDDLE, 2019).

Globalmente, cerca de 17% dos portadores de AF são afetados por acidentes vasculares cerebrais (AVC), sendo o AVC isquêmico o mais comum. Assim como a maioria das outras complicações da anemia falciforme, o AVC está relacionado com o processo vaso-oclusivo e embolismo devido a hiperviscosidade e hipercoagulabilidade sanguínea apresentada pelos pacientes (MENAA, 2013). Nos adultos, as complicações no sistema nervoso são as principais causas de morbimortalidade (DEBAUN; KIRKHAM, 2016)

Ainda, os olhos, pênis e rins podem ser afetados durante as crises vaso-oclusivas que podem provocar lesões na córnea, priapismo e nefropatia falciforme, respectivamente (DEBAUN; KIRKHAM, 2016; HARIRI et al., 2018; KATO, 2012). Além do acometimento destes diversos órgãos, também é comum o desenvolvimento de úlceras nos membros inferiores, sendo estas consideradas as complicações cutâneas mais comuns na AF (ECKMAN, 1996; MINNITI; KATO, 2016).

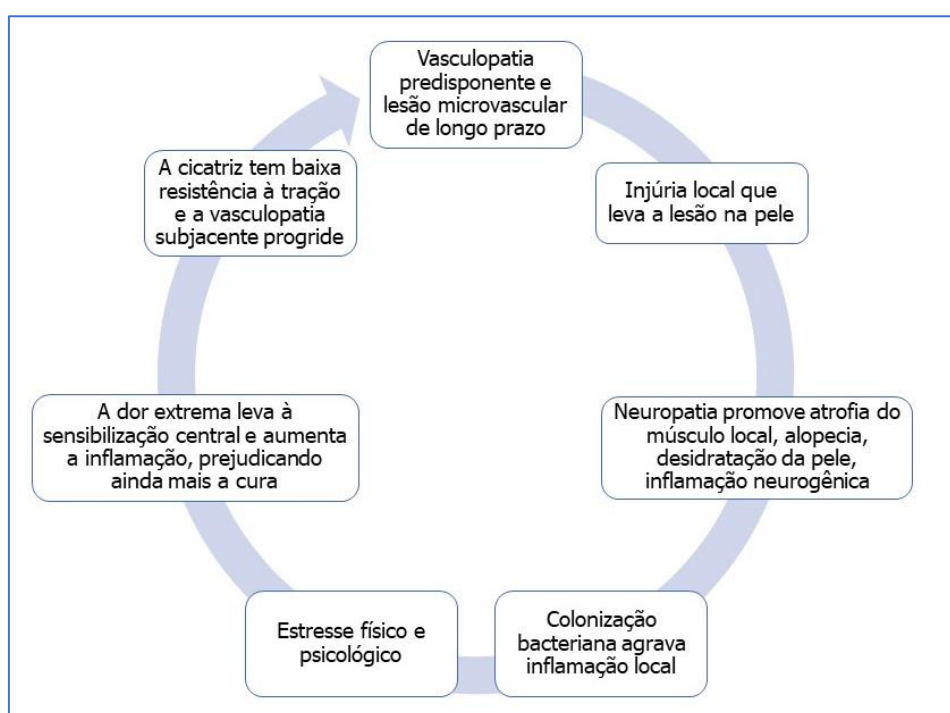
#### 1.1.2.1 Úlcera falciforme

O desenvolvimento da úlcera falciforme é decorrente de diversos fatores. Dentre estes, destacam-se as alterações no transporte de oxigênio, diminuição do fluxo sanguíneo de pequenos vasos devido à depleção de NO e à vaso-oclusão, aumento da viscosidade sanguínea e alteração na coagulação, culminando na isquemia, que está intimamente relacionada com o aparecimento das úlceras (LADIZINSKI et al., 2012).

Esse tipo de complicação ocorre em cerca de 8 a 10% dos pacientes com AF, e alguns estudos relatam que a incidência pode chegar em 50% em pacientes residentes de áreas tropicais (BELINI JUNIOR et al., 2015; PALADINO, 2007). O aparecimento de úlceras pode ser

desencadeado de forma espontânea devido à vaso-oclusão ou ainda em consequência de algum trauma leve, que devido a fisiopatologia e alterações vasculares da doença que prejudicam a cicatrização, fazendo com que uma pequena lesão se torna uma úlcera. Este fenômeno é mais comum em áreas como a região maleolar interna e tibial anterior, pois elas possuem menos tecido subcutâneo e apresentam pele mais fina (PALADINO, 2007).

Minniti e Kato (2016) propuseram um mecanismo multifatorial de desenvolvimento das úlceras (Figura 3), que vão desde as alterações vasculares citadas anteriormente, até alterações neuropáticas e inflamação neurogênica secundárias à vasculopatia. Nesse contexto, é bastante plausível que a AF seja um importante fator de risco no desenvolvimento dessas lesões na pele, uma vez que a ulceração cutânea em pacientes saudáveis é um fenômeno bastante raro.



**Figura 3** - Mecanismos fisiopatológicos da úlcera falciforme.

**Fonte:** Adaptado de Minniti; Kato (2016).

Além disso, os mesmos autores agruparam características padrões das úlceras, classificando-as em 3 tipos: 1 – úlcera única: desenvolvida apenas uma vez durante a vida, normalmente na segunda década de vida, e nem sempre são diagnosticadas devido a baixa frequência de crises dolorosas e inobservância médica; 2 – úlcera de fechamento: úlceras pequenas e recorrentes, que reaparecem a cada 6-12 meses mas não causa debilitação do paciente; 3 – úlcera crônica, recorrente: nesse último caso, as úlceras persistem por anos ou se

repetem no local próximo, causando dor crônica e levando a consequências como má qualidade de vida.

No Brasil a prevalência de úlceras varia entre as idades, ocorrendo de 23,4 a 50% na população adulta, além de ser considerada um bom marcador de gravidade da doença (BELINI JUNIOR et al., 2015). Já em países norte-americanos, a prevalência varia entre 1 e 10%. Destaca-se que em países como a Jamaica, as úlceras ocorrem em cerca de 75% da população adulta, representando uma complicação alarmante nos pacientes com AF. Nesse contexto, observa-se que a presença dessa complicação varia entre países devido a diversos fatores, entre eles a idade, sexo e condições demográficas/socioeconômicas (ANTWI-BOASIAKO et al., 2020).

### 1.1.3 Alterações laboratoriais na anemia falciforme

A anemia falciforme é caracterizada por uma anemia grave crônica, com alterações em diversos parâmetros hematológicos. No hemograma, normalmente ocorre diminuição na contagem total de hemácias circulantes devido às hemólises, presença de drepanócitos nos esfregaços sanguíneos, diminuição dos níveis de hemoglobina e do hematócrito. Ainda, esses níveis podem se apresentar em valores mais baixos durante crises de vaso-oclusão e de dor (ABUBAKAR; AHMAD; FARUK, 2019; ANTWI-BOASIAKO et al., 2018; SANT'ANA et al., 2017).

A contagem de leucócitos totais pode se apresentar aumentada em indivíduos com a patologia, sendo a leucocitose considerada um fator de risco para morte precoce relacionada à AF. Dentre os leucócitos, os neutrófilos são fortemente correlacionados com os níveis de gravidade da doença. Essa correlação pode estar relacionada com a capacidade dos neutrófilos de se aderirem aos capilares e, juntamente com os drepanócitos, plaquetas e proteínas, gerarem a vaso-oclusão (EMMANUELCHIDE; CHARLE; UCHENNA, 2011; OKPALA, 2004).

Alterações nos níveis dos lipídios plasmáticos também são observados na AF. O aumento da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) e a diminuição da Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) já foram descritos como marcadores de gravidade da doença (SEIXAS et al., 2010), uma vez que o HDL reduz o risco de hemólise e disfunção endotelial (SHORES et al., 2003). Além disso, há diversos relatos de níveis de triglicérides elevados associados à diminuição do HDL nos pacientes (ALELUIA et al., 2017).

Pacientes com AF e com úlceras apresentam alterações laboratoriais significantes quando comparados a pacientes com AF sem úlcera. Níveis de hemácias totais, hemoglobina e

hematócrito encontram-se diminuídos em pacientes com úlcera, enquanto há aumento da contagem de leucócitos totais e de plaquetas, com correlação positiva entre esses últimos parâmetros e o tamanho da úlcera (BABALOLA et al., 2021). Além disso, moléculas inflamatórias como as citocinas IL-8, IL-10 e IL-15 também se apresentam elevadas nesses pacientes (BELISÁRIO et al., 2020).

## 1.2 INFLAMAÇÃO E ANEMIA FALCIFORME

A inflamação é uma resposta fisiológica à um estímulo nocivo ao tecido, que pode ser causado por uma lesão, agente infeccioso e ainda devido a um mau-funcionamento tecidual. Além dos componentes celulares e estruturais do próprio tecido afetado, a resposta inflamatória recruta componentes plasmáticos e células do sistema imune que migram para o sítio de lesão, a fim de proteger o tecido e eliminar o agente causador da inflamação. Essa inflamação é classificada em aguda quando é solucionada em um curto período de tempo, e em crônica quando o estímulo persiste e, portanto, a inflamação não se resolve (KUMMAR et al., 2013; MEDZHITOV, 2008).

A inflamação é reconhecida pelos cinco sinais cardinais da inflamação: calor, dor, rubor, edema e perda de função. O processo inflamatório agudo é iniciado a partir da lesão ou microrganismo, e envolve alterações bioquímicas, vasculares e celulares. (ALESSANDRI et al., 2013).

O processo inflamatório é desencadeado por padrões moleculares específicos, como os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) ou dano (DAMPs) (ZINDEL; KUBES, 2020). Esses estímulos são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) dos leucócitos, como os receptores do tipo *Toll* (TLR), que levam à ativação de vias de sinalização celular como a da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e subsequente recrutamento de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa-B (NF-κB). Essas vias regulam a produção de mediadores inflamatórios, e quando estão ativas passam a estimular a síntese e liberação desses mediadores (CHEN et al., 2018).

Os mediadores inflamatórios produzidos têm ação específica a depender de sua classe. As aminas vasoativas, como a histamina, estimulam a dilatação capilar que resulta em estase e migração celular, além do extravasamento de plasma que gera o rubor, calor e edema local (BENNETT et al., 2018). Já as citocinas, dentre elas as interleucinas, quimiocinas e o fator de necrose tumoral, são mediadores proteicos produzidas para recrutamento e ativação de leucócitos a fim de combater o patógeno a partir de fagocitose, liberação de grânulos ou de

espécies reativas de oxigênio (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012). Além destes, mediadores plasmáticos são produzidos pelo fígado como as proteínas do complemento e as cininas, que agem combatendo o patógeno e induzindo dor e febre, respectivamente (KUMMAR et al., 2013). Também são produzidos mediadores lipídicos a partir do ácido araquidônico, como as prostaglandinas e leucotrienos, que geram alterações vasculares, estimulam quimiotaxia e provocam dor e febre. Contudo, evidências indicam que os processos inflamatórios resultam de uma ação conjunta e dinâmica destes diferentes tipos de mediadores (DENNIS; NORRIS, 2015).

O processo inflamatório que ocorre em pacientes com AF é denominado inflamação estéril, uma vez que não há um agente microbiano ou seus produtos como estímulo inicial do processo. Os produtos intraeritrocitários como o heme que são liberados durante o processo de hemólise, são reconhecidos como DAMPs pelos TLRs dos leucócitos, ativando-os. Além disso, o processo de vaso-oclusão gerado pelos drepanócitos, leucócitos e plaquetas também estimulam o processo inflamatório, uma vez que geram lesões isquêmicas teciduais (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2018).

Todos esses estímulos geram a ativação de leucócitos, estimulando a produção de citocinas, espécies reativas de oxigênio e metabólitos do ácido araquidônico como as prostaglandinas e leucotrienos. Além disso, o sistema complemento e via de coagulação também podem ser ativados via DAMPs, uma vez que plaquetas possuem TLR2 e TLR4 e sua ativação pode influenciar no recrutamento de leucócitos, pois quando estão ativas passam a expressar P-selectina que se liga à leucócitos e facilita sua chegada no sítio inflamatório (ZINDEL; KUBES, 2020).

### **1.2.1 Eicosanoides e suas funções em doenças inflamatórias**

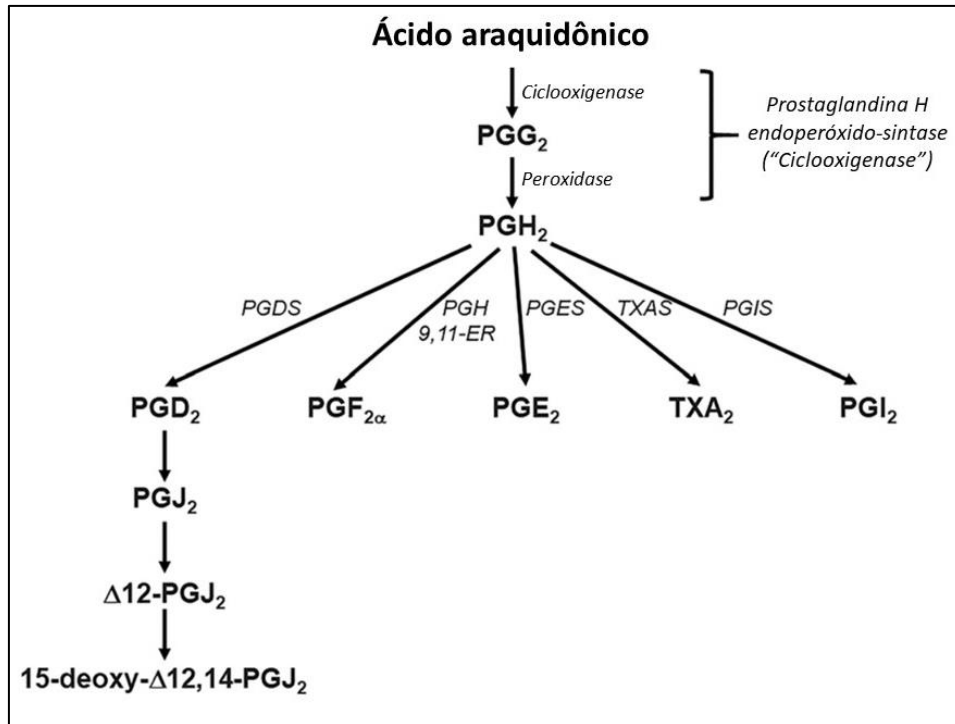
Os eicosanoides são mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico e de outros ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) que possuem funções homeostáticas e inflamatórias. A formação desses mediadores se dá pela oxidação do ácido araquidônico (AA) pelas enzimas como as ciclooxigenases (COX), lipoxigenases (LO) e enzimas do citocromo P450 (DENNIS; NORRIS, 2015).

Uma vez que o AA é armazenado de forma esterificada em fosfolipídios de membrana, a formação dos eicosanoides é iniciada pela hidrólise catalisada por um conjunto de enzimas da classe das fosfolipases, coletivamente chamadas de fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>). (CHIURCHIÙ; LEUTI; MACCARRONE, 2018). A família das PLA<sub>2</sub> engloba 16 grupos de enzimas com

estruturas e funções diversas. Dentro desse grupo, destacam-se três enzimas principais: a do tipo citosólica (cPLA<sub>2</sub>) dependente de cálcio, a secretória (sPLA<sub>2</sub>) e a do tipo independente de cálcio (iPLA<sub>2</sub>). A cPLA<sub>2</sub> é regulada por cálcio e fosforilação, enquanto a iPLA<sub>2</sub> é regulada por ATP e a sPLA<sub>2</sub>, expressa tipos específicos de células, como as do sistema imunológico e epiteliais, é regulada XXX (MOUCHLIS; DENNIS, 2019).

Diversos estímulos podem desencadear a síntese de eicosanoides, desde substâncias relevantes fisiologicamente como os hormônios, como também antígenos microbianos, alérgenos, citocinas e agentes oxidantes, que agem ou alterando a disponibilidade de cálcio intracelular de forma direta, ou via transdução de sinal dependente de receptor (BROCK; PETERS-GOLDEN, 2007).

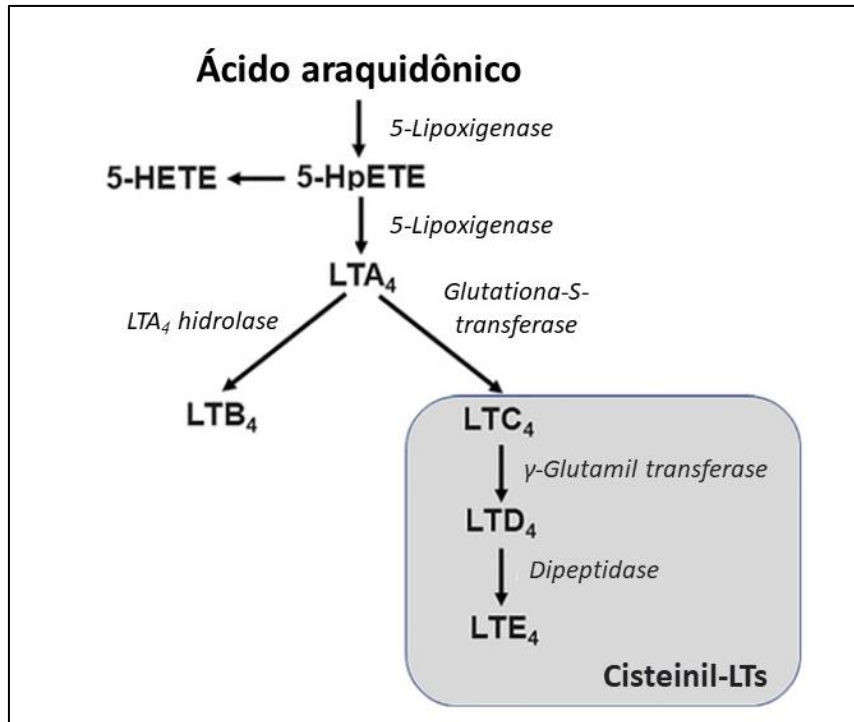
Após a liberação pela enzima PLA<sub>2</sub>, o AA fica disponível para servir como substrato para enzimas envolvidas na síntese de eicosanoides, tais como as COXs e LOXs, que geram produtos distintos e com funções diversas. A COX possui duas isoformas principais em humanos: a COX-1 e a COX-2. Enquanto a COX-1 é classicamente considerada constitutiva, com função fisiológica por mediar a síntese de mediadores em condições homeostáticas, a COX-2, classificada como induzível, por ter sua expressão e ativação aumentadas a partir de estímulos inflamatórios. Uma vez liberado pela PLA<sub>2</sub>, o AA é metabolizado pela COX em prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>), que em seguida é transformado em prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). A partir da PGH<sub>2</sub> são gerados diversos prostanoides, como PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, a partir da ação de PG sintases específicas. Além destas prostaglandinas, a PGH<sub>2</sub> é metabolizada pela TXA<sub>2</sub> sintase, gerando o TXA<sub>2</sub>, um mediador com importantes funções hemostáticas (CALDER, 2020).



**Figura 4 - Metabolismo do ácido araquidônico pela via das ciclooxigenases.** PG = prostaglandina; PGDS = prostaglandina D sintase; PGES = prostaglandina E sintase; PGH 9,11-ER = prostaglandina H 9,11-endoperóxido redutase; PGIS = prostaglandina I sintase; TX = tromboxano; TXAS = tromboxano A sintase.

**Fonte:** Adaptado de Calder (2020).

Ainda no que diz respeito à síntese de eicosanoides, outra via fundamental no metabolismo do AA é aquela mediada pelas LO. Dentre as diversas LO, a 5-LO é a que está envolvida na formação de leucotrienos e é expressa principalmente em células de origem mieloides. A cascata de reações dessa via é iniciada pela produção do ácido 5-hidroperoxiêicosatetraenóico (5-HpETE) a partir do AA pela 5-LO. Essa molécula é então convertida em 5-hidroxiêicosatetraenóico (5-HETE), e depois em leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) que, assim como a PGH<sub>2</sub> na via das COX, age como um intermediário que pode ser convertido em leucotrienos diversos, como o LTB<sub>4</sub>, um leucotrieno com funções importantes em doenças inflamatórias e infecciosas, e em cisteinil-leucotrienos (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>) que são substâncias principalmente relacionadas com a patogênese de doenças alérgicas como a asma (BIRINGER, 2020; CALDER, 2020; PETERS-GOLDEN et al., 2005).



**Figura 5 - Metabolismo do ácido araquidônico pela via da 5-Lipoxigenase.**  
 Fonte: Adaptado de Calder (2020).

Por fim, outra via que o AA pode seguir é a via de enzimas epoxigenases do citocromo P450, gerando ácidos epoxieicosatrienólicos (EETs). Esse conjunto de enzimas estão presentes em diversas células e órgãos, com propriedades antiarrítmicas e analgésicas na dor neuropática e inflamatória (SPECTOR; KIM, 2015)

Após sua produção, os eicosanoides se ligam em seus receptores celulares, todos associados à proteína G. Os prostanoides, provenientes da via da COX, possuem 9 receptores identificados: a  $PGD_2$  possui dois receptores denominados  $DP_1$  e  $DP_2$ ; a  $PGF_{2\alpha}$  o receptor  $FP$ ; a  $PGE_2$  possui quatro receptores, o  $EP_1$ ,  $EP_2$ ,  $EP_3$  e  $EP_4$ ; a  $PGI_2$  o receptor  $IP$ ; e o  $TXA_2$  o receptor  $TP$  (MATSUOKA; NARUMIYA, 2007). Da mesma forma, os leucotrienos, provenientes da LOX possuem receptores específicos: o  $LTB_4$  possui dois receptores específicos, o  $BLT_1$  e o  $BLT_2$ ; e os cisteinil-leucotrienos os receptores  $CysLT_1$  e  $CysLT_2$ . No entanto, os receptores de  $BLT_2$  podem ser ativados por outros metabólitos além do  $LTB_4$  (YOKOMIZO; NAKAMURA; SHIMIZU, 2018).

A  $PGE_2$  é a prostaglandina mais abundante e exerce funções tanto fisiológicas como patológicas. No contexto inflamatório, esse prostanóide induz os eventos da inflamação aguda e recrutamento de leucócitos via receptores  $EP_2$  e  $EP_4$ , ambos associados a proteína Gs (excitatória, devido aumento do cAMP); e ativação de mastócitos, vasodilatação e aumento de permeabilidade via receptor  $EP_3$  associado à proteína  $G_i$  (TSUGE et al., 2019).



Dentre os leucotrienos, o LTB<sub>4</sub> é o mais relacionado com o contexto pró-inflamatório. Ao se ligar aos receptores BLT<sub>1</sub> (alta afinidade, associado a proteína Gi ou Gq) e BLT<sub>2</sub> (baixa afinidade, associado a proteína Gi), promove eventos da inflamação aguda como migração e quimiotaxia de leucócitos, estímulo da fagocitose e a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (BRANDT; SEREZANI, 2017).

Na anemia falciforme, níveis elevados de PGE<sub>2</sub> estão associados a crises de vaso-occlusão e de dor (GRAIDO-GONZALEZ et al., 1998). Além disso, o LTB<sub>4</sub> também está elevado em indivíduos com AF em estado basal, e se eleva ainda mais em crises vaso-oclusivas e de síndrome torácica aguda (SETTY; STUART, 2002). Nesse contexto, esses eicosanoides podem ser considerados bons marcadores de gravidade da doença.

## 2 JUSTIFICATIVA

Estudos epidemiológicos relatam que a anemia falciforme é a doença genética monogênica mais comum no Brasil. É considerada um problema de saúde pública, sendo a Bahia o estado brasileiro com maior prevalência, apresentando uma taxa de casos de 1 para cada 650 nascidos vivos (BRASIL, 2012; SILVA et al., 2016). O tratamento farmacológico convencional é feito com hidroxiureia, no entanto o efeito terapêutico pode variar de acordo com o indivíduo, podendo desencadear efeitos adversos (MEIER, 2018), o que justifica a necessidade de se buscar novos fármacos e abordagens terapêuticas para o tratamento da doença.

Embora já seja bem estabelecido o papel da resposta inflamatória na patogênese da AF, diversos mecanismos e vias nesse processo, como o metabolismo lipídico e vias associadas à síntese de eicosanoides, permanecem pouco esclarecidos. Nesse contexto, os modelos murinos de AF, são relevantes para o estudo da fisiopatologia da doença e nos testes pré-clínicos de terapias, pois mimetizam a doença humana. Em contrapartida, na literatura poucos são os estudos com modelos murinos de AF. Nesse contexto, a caracterização do metabolismo e dessas vias nesses modelos pode sugerir novos alvos terapêuticos para a AF.

A úlcera falcêmica é uma das diversas complicações da doença, possuindo causa multifatorial e sendo considerada um bom marcador de gravidade. Assim, a caracterização das alterações dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e inflamatórios de modelos murinos com AF com úlcera pode contribuir com o entendimento de seu desenvolvimento, além de propor biomarcadores de acompanhamento e identificação de novos alvos terapêuticos.

### **3 HIPÓTESE**

Os parâmetros hematológicos, bioquímicos e inflamatórios basais de camundongos falciformes estão alterados, e processo inflamatório induzido pelo modelo de úlcera cutânea é exacerbado em camundongos falciformes em comparação com animais saudáveis.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar os parâmetros hematológicos, bioquímicos e inflamatórios basais de camundongos humanizados para anemia falciforme, e avaliar as alterações locais e sistêmicas induzidas pela úlcera cutânea nestes animais.

#### **4.1.1 Objetivos específicos**

- Comparar camundongos transgênicos saudáveis, com traço falciforme e com anemia falciforme quanto ao perfil bioquímico (lipídico, hepático e renal) e hematológico basal;
- Avaliar a expressão de genes relacionados com síntese de eicosanoides em modelo murino de úlcera falcêmica;
- Analisar as alterações no infiltrado leucocitário induzidas pela úlcera cutânea na pele de camundongos falciformes;
- Quantificar os níveis séricos de eicosanoides em camundongos falciformes submetidos ou não ao protocolo de úlcera cutânea
- Correlacionar as alterações bioquímicas, hematológicas e inflamatórias em camundongos falciformes submetidos ou não ao protocolo de úlcera cutânea

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Neste projeto foram utilizados camundongos transgênicos machos e fêmeas da linhagem Townes B6:129 ( $Hba^{tm1(HBA)Tow} Hbb^{tm2(HBG1,HBB*)Tow}/Hbb^{tm3(HBG1,HBB)Tow/J}$ ), com idade variando entre 4 e 6 meses. Estes animais podem ser considerados camundongos humanizados para anemia falciforme, uma vez que seu desenvolvimento se dá a partir da substituição do gene de globina murina pelos genes da globina humana.

Neste sentido, três genótipos distintos são possíveis para esses animais:

1. B6:129 subtipo AA: camundongos saudáveis, homocigotos, carregando duas cópias do gene da  $\alpha$ -globina humana.
2. B6:129 subtipo AS: camundongos com traço falcêmico, heterocigotos, carregando uma cópia do gene da  $\alpha$ -globina humana e uma cópia do gene da  $\beta$ -globina humana falcêmica.
3. B6:129 subtipo SS: camundongos com anemia falciforme, homocigotos, carregando duas cópias do gene da  $\beta$ -globina humana falcêmica.

Os animais foram desenvolvidos no laboratório do Dr. Tim Townes, da Universidade do Alabama – USA, e obtidos do através da Jackson Lab. Os camundongos foram mantidos em gaiolas no biotério do Instituto Gonçalo Moniz (IGM), com acesso livre a comida e água e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12h/12h. Todos os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animais do IGM sob os protocolos de números 021/2019 e 002/2020 e executados de modo a preservar ao máximo o bem-estar animal, conforme recomendação da Resolução Normativa CONCEA nº 30, de 2 de fevereiro de 2016. O uso dos animais geneticamente modificados foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do IGM (PVBIO-106-IGM).

### 5.2 CARACTERIZAÇÃO BASAL

Os camundongos foram divididos em 3 grupos: AA, AS e SS (n=8). Inicialmente, os animais do grupo AA e AS foram anestesiados com o anestésico Xilazina/Ketamina, preparados na concentração de 1:4 na dose de 10mg/kg por via intraperitoneal. Já os animais SS foram anestesiados com Isoflurano por inalação em câmara de anestesia. Depois de

anestesiados, os animais foram pesados e o pelo do dorso dos animais foi removido utilizando o creme depilatório Veet.

Com auxílio de um punch de biópsia, foram coletados 4 fragmentos de pele do dorso dos animais destinados a análises diferentes. O primeiro fragmento foi fixado em Formol 10% para análise histológica; o segundo foi colocada em RNAlater e congelada a -80 °C para análises de biologia molecular; o terceiro foi congelada em O.C.T. (*Tissue Tek*®) e o quarto fragmento foi congelado diretamente a -80 °C, estas duas últimas amostras pra análises posteriores. Além disso, concomitantemente foram coletadas amostras de sangue total em tubos contendo EDTA, bem como uma amostra de sangue em um eppendorf para obtenção de soro, por punção cardíaca. Os animais foram então eutanasiados para coleta do fígado, baço, rins e pulmão, que foram pesados e fixados em Formol 10% para análises posteriores.

### 5.3 MODELO DE ÚLCERA CUTÂNEA

Conforme descrito anteriormente, os animais foram divididos em grupos e anestesiados (n=8). Utilizando um punch de biópsia, foram realizadas 4 úlceras de 4mm no dorso dos animais, que foram mantidos por 24h ou 72h no biotério do IGM. Decorrido esses períodos, os animais foram anestesiados e eutanasiados, e o sangue, os órgãos e as úlceras com o tecido circundante foram coletados, com mesmo destino do experimento de caracterização basal.

### 5.4 HEMOGRAMA E LEUCOGRAMA

Após as coletas, as amostras de sangue total foram imediatamente enviadas para o Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (UFBA), onde foram realizadas estas análises. Os parâmetros hematológicos de Hemácias totais, Hemoglobina, Hematócrito, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Amplitude de Distribuição de Eritrócitos (RDW), Drepanócitos por Campo e Plaquetas Totais foram quantificados por metodologia automatizada utilizando o equipamento URIT 5160 Vet. Se houvesse agregados plaquetários, a contagem automática era desconsiderada e o número de plaquetas determinado manualmente em esfregaços de sangue.

A contagem total de leucócitos foi feita utilizando metodologia automatizada no mesmo equipamento. Já a contagem diferencial e avaliação morfológica de leucócitos foram realizadas

em esfregaços de sangue corados de Romanowsky, quantificando e diferenciando 100 células na objetiva de 400x.

## 5.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A amostra de sangue coletada em eppendorf foi centrifugada a 1500rpm por 15min para obtenção do soro. Logo após, o soro extraído foi aliquoteado e enviado para o Hospital de Medicina Veterinária da UFBA, onde foram realizadas as análises.

O perfil lipídico (triglicerídeos e colesterol total), o perfil hepático (aspartato aminotransferase [AST] e alanina aminotransferase [ALT]) e perfil renal (ureia e creatinina) foram analisados por método automatizado no espectrofotômetro Smart Vet 200+.

## 5.6 PCR EM TEMPO REAL

### 5.6.1 Extração de RNA

As amostras conservadas em RNAlater (Invitrogen) a  $-20^{\circ}\text{C}$  foram maceradas com 1ml de TRIzol (Invitrogen), e a extração foi feita pela técnica fenol-clorofórmio. Após a maceração, o conteúdo foi transferido para um eppendorf juntamente com  $200\mu\text{L}$  de clorofórmio, agitados por 15 segundos, incubados por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugados a  $12.000g$  por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa foi transferida para um novo eppendorf, onde foi adicionado  $400\mu\text{L}$  de isopropanol, homogeneizado por inversão durante 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugado a  $12.000g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet de RNA preservado no fundo do tubo foi suspenso com  $800\mu\text{L}$  de etanol 75% e centrifugado a  $10.000g$  por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida o etanol foi removido, e o tubo foi deixado aberto em capela química para secar. O RNA foi então dissolvido em  $20\mu\text{L}$  de água livre de RNase e incubado por 10 minutos em banho-maria seco a  $56^{\circ}\text{C}$ . Por fim, o RNA foi quantificado por espectrofotometria no NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific) e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 5.6.2 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada por transcrição reversa do mRNA com o kit *SuperScript™ IV VILO™ Master Mix with ezDNase™ Enzyme* (Invitrogen) seguindo o protocolo da fabricante, na concentração de 1000 ng/μL.

### 5.6.3 Expressão gênica

A análise da expressão dos genes envolvidos com a síntese de eicosanoides (descritos na tabela 1) foi feita em duplicata por PCR em Tempo Real (qPCR), utilizando o aparelho ABI 7500. Foram utilizados 10nG do cDNA sintetizado, 400μM dos primers (listados na tabela 1) e o SYBR Green Real-Time PCR Master Mixes (Applied Biosystems) como sonda da amplificação, totalizando 20 μL de volume final. As etapas da qPCRs foram realizadas de acordo com os seguintes parâmetros: uma etapa de 50 °C por 20 segundos. Uma de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, uma etapa de 60°C por 1 minuto e uma de 95°C por 15 segundos. A expressão relativa foi calculada utilizando o ciclo limite comparativo (Ct) e expresso de modo comparado ao controle (método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), além de ter como parâmetro o gene constitutivo (endógeno) ACTB. Todos os primers foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT).

**Tabela 1** – Lista de genes alvo, sua função e sequência dos primers utilizados.

GENE ALVO	FUNÇÃO	PRIMER	
		FORWARD	REVERSE
ACTB	Controle endógeno	5'-	5'-
		ACTGTCGAGTCGCGTCCA	GTCATCCATGGCGAACTGG
		-3'	-3'
PTGS1 (COX-1)	Síntese de prostanoides	5'-	5'-
		GGCATTGCACATCCATCC	GTAACAACAGGGATTGACT
		AC-3'	GGT-3'
PTGS2 (COX-2)	Síntese de prostanoides	5'-	5'-
		CTACGGAGAGAGTTCATC	TCTCCACCAATGACCTGAT
		CC-3'	A-3'



<b>ADRP/ PLIN2</b>	Síntese de corpúsculos lipídicos	5'- CTTTGCTGTGTGGTGATCT G-3'	5'- TCATCACCACGCTCTGTT-3'
<b>ALOX-5 (5-LO)</b>	Síntese de leucotrienos	5'- ATTGAGAAGCGCAAATAC TGG-3'	5'- TCCACTCCATCCATCGATA CTG-3'
<b>PLA2G4A</b>	Liberção de ácido araquidônico	5'- TCTCATTTAACTCTGGGA ACTGCTTC-3'	5'- TCCAGCATATCGCCAAAGG -3'

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

## 5.7 DOSAGEM DE EICOSANOIDES

Amostras de soro foram obtidas como descrito anteriormente e os níveis de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> foram quantificados por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) por competição de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical, MI, USA). Inicialmente, as amostras foram diluídas em ELISA *Buffer* na proporção de 1:100 para a dosagem de PGE<sub>2</sub> e de 1:10 para a dosagem de LTB<sub>4</sub>. Em placa de 96 poços, 50µl das amostras foram incubadas com 50µl de *Tracer* (antígeno específico ligado à acetilcolina) e 50µl de anti-soro (anticorpo específico) por 18h para o PGE<sub>2</sub> e *overnight* para o LTB<sub>4</sub>. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (*Wash buffer*, água destilada e polisorbato 20) e secadas. 200µl do reagente revelador (*Ellman's reagent* – enzima acetilcolinesterase) foi adicionado em cada poço, as placas foram envolvidas em papel alumínio e colocadas em placa agitadora por 90min ou 120min para PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub>, respectivamente. A leitura foi realizada no espectrofômetro Spectramax 340pc no comprimento de onda de 420nm. As concentrações dos eicosanoides foram calculadas a partir da curva padrão de concentrações conhecidas e expressas em pg/ml.

## 5.8 ANÁLISE DO INFILTRADO LEUCOCITÁRIO

As biópsias dos tempos 0h, 24h e 72h foram fixadas em Formol 10% por 72h imediatamente após a coleta. Logo após foram enviadas para o setor de Histotecnologia do IGM para processamento, emblocamento e coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E), sendo que as seções coradas foram seccionadas da parte central da úlcera.

Foi analisado o infiltrado inflamatório de 10 imagens aleatórias das bordas das úlceras obtidas no microscópio Leica DMI8 na objetiva de 1000x. A quantificação dos leucócitos foi feita manualmente utilizando o software *ImajeJ 1.53*.

## 5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software *Graphpad Prism 8.0.2*. Inicialmente, o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar o tipo de distribuição dos dados. Para os dados paramétricos, foi utilizado o teste de One-way ANOVA para comparar mais de dois grupos. Os dados com essa distribuição foram apresentados com média e desvio padrão.

Já para os dados não paramétricos, as análises foram realizadas utilizando o teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos, e o teste de Kruskal-Wallis para comparação entre mais de dois grupos. Os dados com essa distribuição foram apresentados com mediana e intervalo interquartil.

As diferenças entre os valores foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

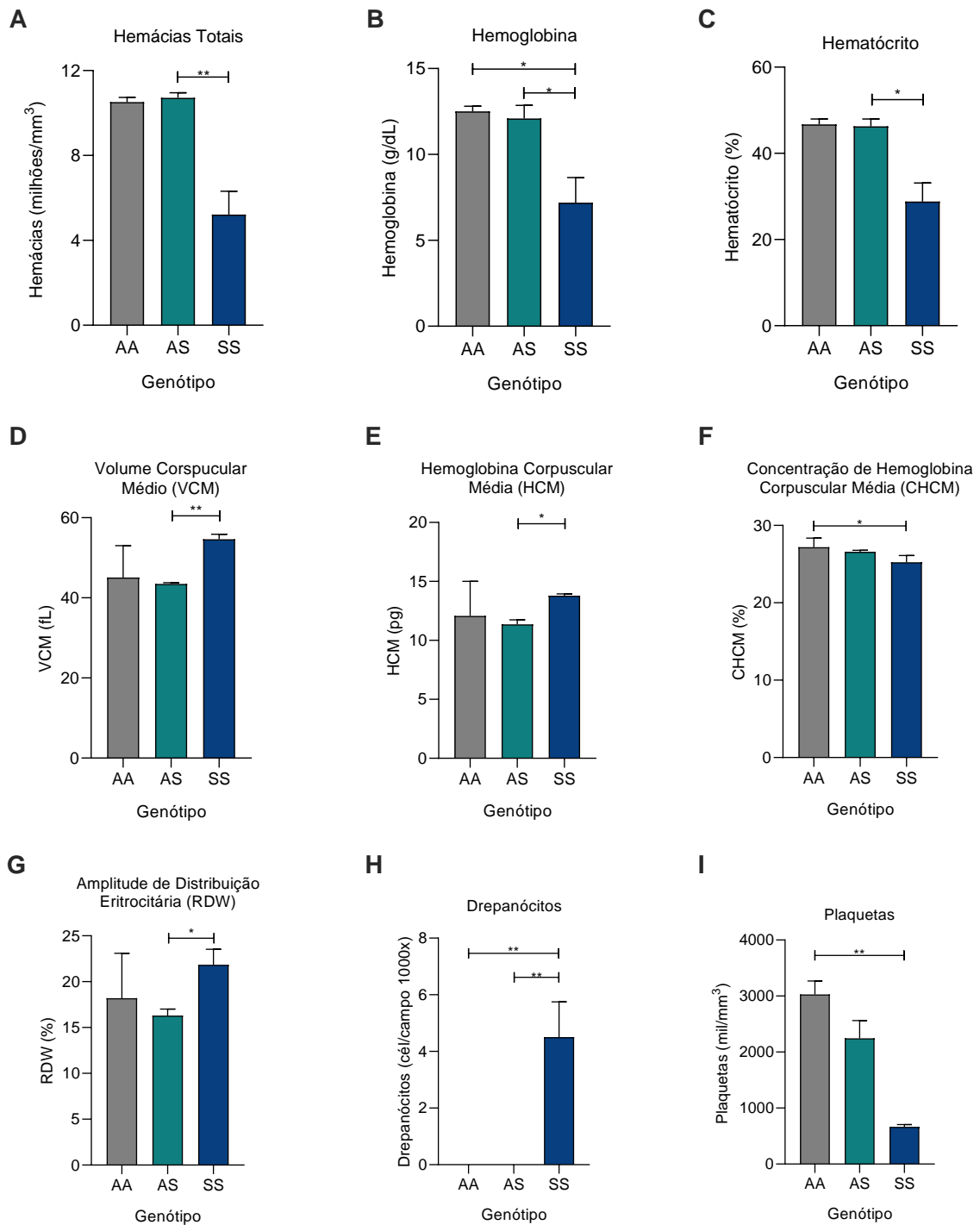
## 6 RESULTADOS

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO BASAL

#### 6.1.1 Hemograma

A fim de caracterizar os parâmetros hematológicos basais entre os grupos controle (AA), traço falciforme (AS) e anemia falciforme (SS), amostras de sangue total de camundongos Towness foram submetidas a análise automatizada. Entre o grupo AS e SS, a contagem de hemácias totais (figura 6A), hemoglobina (figura 6B) e hematócrito (figura 6C) apresentaram-se significativamente diminuídos no grupo falciforme. Entre o grupo AA e SS, os mesmos parâmetros apresentaram diminuição, no entanto considerando os parâmetros XX, YY e o CHCM (figura 6F), apenas este último apresentou diminuição estatisticamente significativa.

A presença de drepanócitos (figura 6H) foi verificada apenas no grupo SS. O mesmo grupo apresentou hemácias com tamanho médio elevado (figura 6D), e ampla variação entre seus tamanhos (figura 6G) em comparação ao grupo AS. Além disso, comparado ao grupo AA, o grupo SS apresentou plaquetopenia severa, enquanto no grupo AS esse evento foi menos significativo (figura 6I). Esses dados sugerem que o grupo SS apresenta anemia hemolítica grave, enquanto o grupo AS não apresenta essa característica, em comparação com os animais saudáveis (AA).

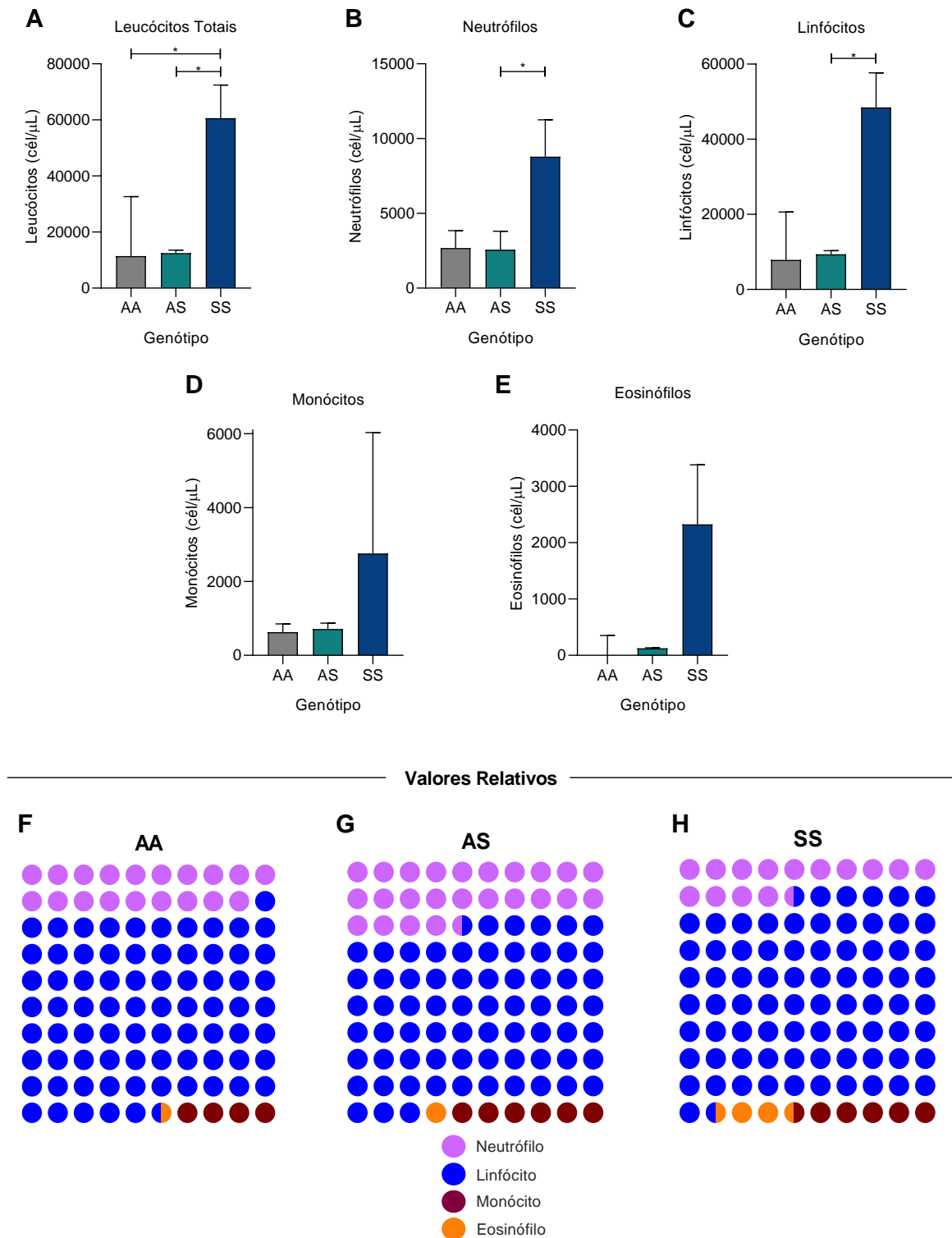


**Figura 6** - Hemograma dos camundongos transgênicos com traço falciforme e anemia falciforme em estado basal comparados com os camundongos transgênicos sadios. **Valores absolutos de hemácias totais (A), hemoglobina (B), hematócrito (C), VCM (D), HCM (E), CHCM (F), RDW (F), drepanócitos (H) e plaquetas (I) foram quantificados no sangue total de camundongos controles (AA, barra cinza), traço falciforme (AS, barra verde) e com anemia falciforme (SS, barra azul), n = 6. Os dados estão apresentados em mediana com intervalo interquartil utilizando o teste de Kruskal-Wallis (\*p < 0,05; \*\* p < 0,01).**

Fonte: Elaborado pelo autor

### 6.1.2 Leucograma

Com a finalidade de caracterizar os parâmetros do leucograma, o sangue total dos grupos AA, AS e SS foram submetidos a análise semiautomatizada para quantificação total e diferencial de leucócitos. O grupo SS apresentou uma maior quantidade de leucócitos totais em relação ao AA e AS (figura 7A), bem como de neutrófilos (figura 7B) e linfócitos (figura 7C) em relação ao grupo AS, todos com diferença estatisticamente significativa. O número de monócitos (figura 7D) e eosinófilos (figura 7E) também estavam maiores no grupo SS em comparação aos demais, mas sem diferença estatística. Esses dados indicam leucocitose no grupo SS, reforçando um contexto inflamatório exacerbado característico da doença, mesmo na ausência de estímulos inflamatórios externos.

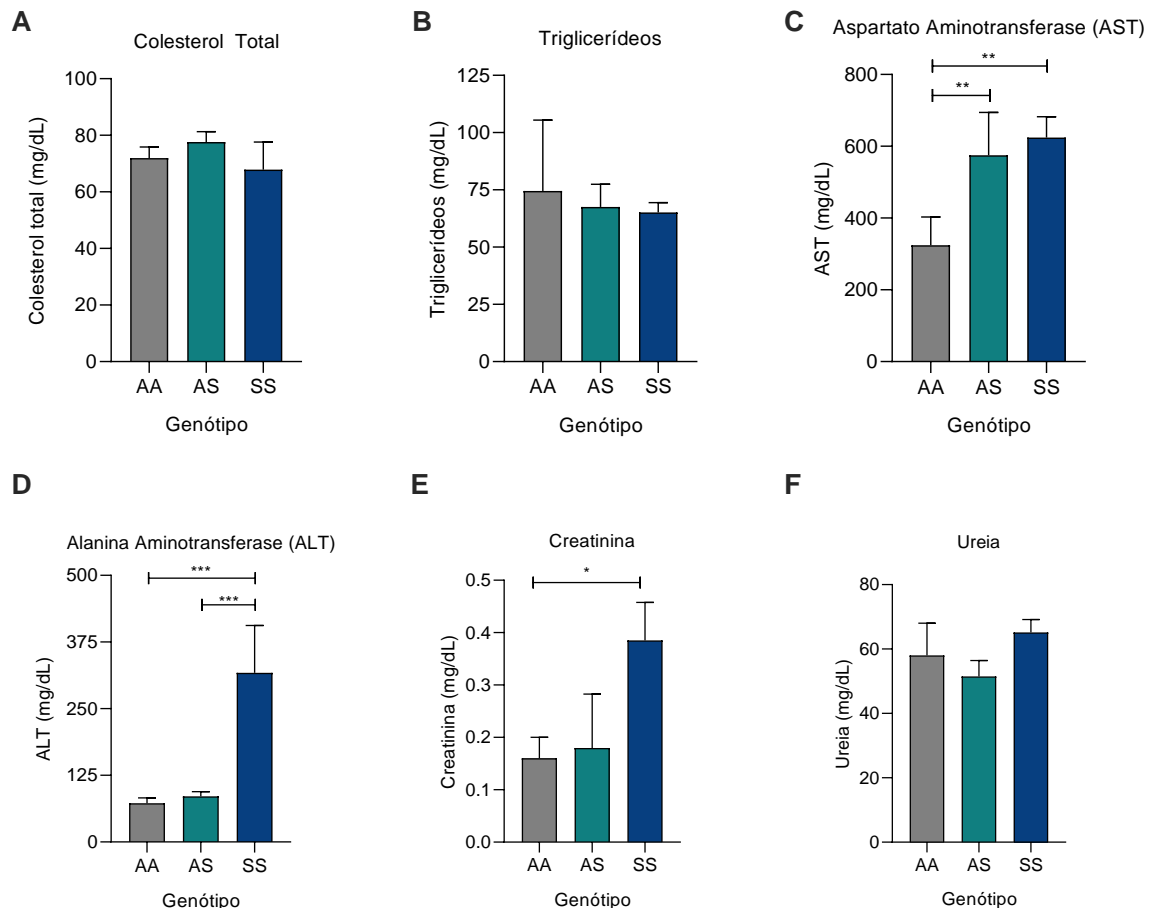


**Figura 7 - Leucograma dos camundongos transgênicos com traço falciforme e anemia falciforme em estado basal comparados com os camundongos transgênicos saudáveis.** Valores absolutos de leucócitos totais (A), neutrófilos (B), linfócitos (C), monócitos (D) e de eosinófilos (E), e seus respectivos valores relativos (F, G e H) foram quantificados no sangue total de camundongos controles (AA, barra cinza), traço falciforme (AS, barra verde) e com anemia falciforme (SS, barra azul),  $n = 5$ . Os dados estão apresentados em mediana com intervalo interquartil utilizando o teste de Kruskal-Wallis (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

**Fonte:** Elaborado pelo autor

### 6.1.3 Dosagens bioquímicas

A fim de avaliar parâmetros bioquímicos relevantes no contexto da doença falciforme, valores de colesterol total, triglicerídeos, AST, ALT, creatinina e ureia, foram dosados no soro dos grupos AA, AS e SS. Foram observadas concentrações elevadas de AST nos grupos AS e SS quando comparados ao grupo controle (figura 8C), e níveis de ALT maiores em camundongos do grupo SS quando comparado aos grupos AA e AS (figura 8D). Além disso, a creatinina do grupo SS também se apresentou em níveis elevados quando comparada ao grupo controle. Todas essas alterações apresentaram significância estatística. Já os níveis de colesterol total, triglicerídeos e ureia não apresentaram (figura 8A, 8B e 8F, respectivamente). Esses resultados sugerem que a AF altera o metabolismo hepático e renal em camundongos humanizados para a doença.



**Figura 8** - Dosagens bioquímicas dos camundongos transgênicos com traço falciforme e anemia falciforme em estado basal comparadas aos camundongos transgênicos saudáveis. Níveis de Colesterol total (A), Triglicerídeos (B), AST (C), ALT (D), Creatinina (E) e Ureia (F) foram quantificados no soro de camundongos controles (AA, barra cinza), traço falciforme (AS, barra verde) e com anemia falciforme (SS, barra azul), n=6. Os

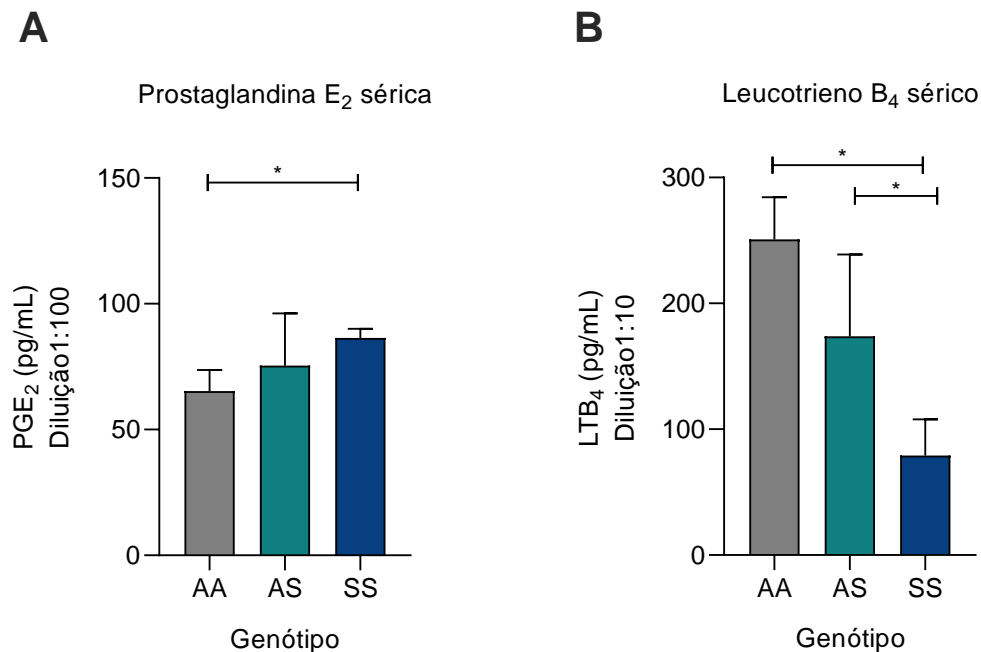
dados estão apresentados em média com desvio padrão utilizando o teste One-Way ANOVA (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

Fonte: Elaborado pelo autor

#### 6.1.4 Quantificação de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> séricos

Com o intuito de avaliar se os camundongos com traço falciforme e anemia falciforme apresentam diferenças basais nos níveis de eicosanoides em comparação com os animais saudios, foi realizada a dosagem de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> no soro destes animais.

Em estado basal, animais SS possuem níveis de PGE<sub>2</sub> (figura 9A) e LTB<sub>4</sub> (figura 9B) séricos significativamente elevados e reduzidos, respectivamente, em comparação ao grupo AA. Ainda em estado basal, o grupo AS também apresenta uma maior quantidade de LTB<sub>4</sub> circulante quando comparado ao SS (figura 9B). Esses dados, juntos com a observação da leucocitose observada (figura 7), reforçam o processo inflamatório causado pela AF neste modelo animal.



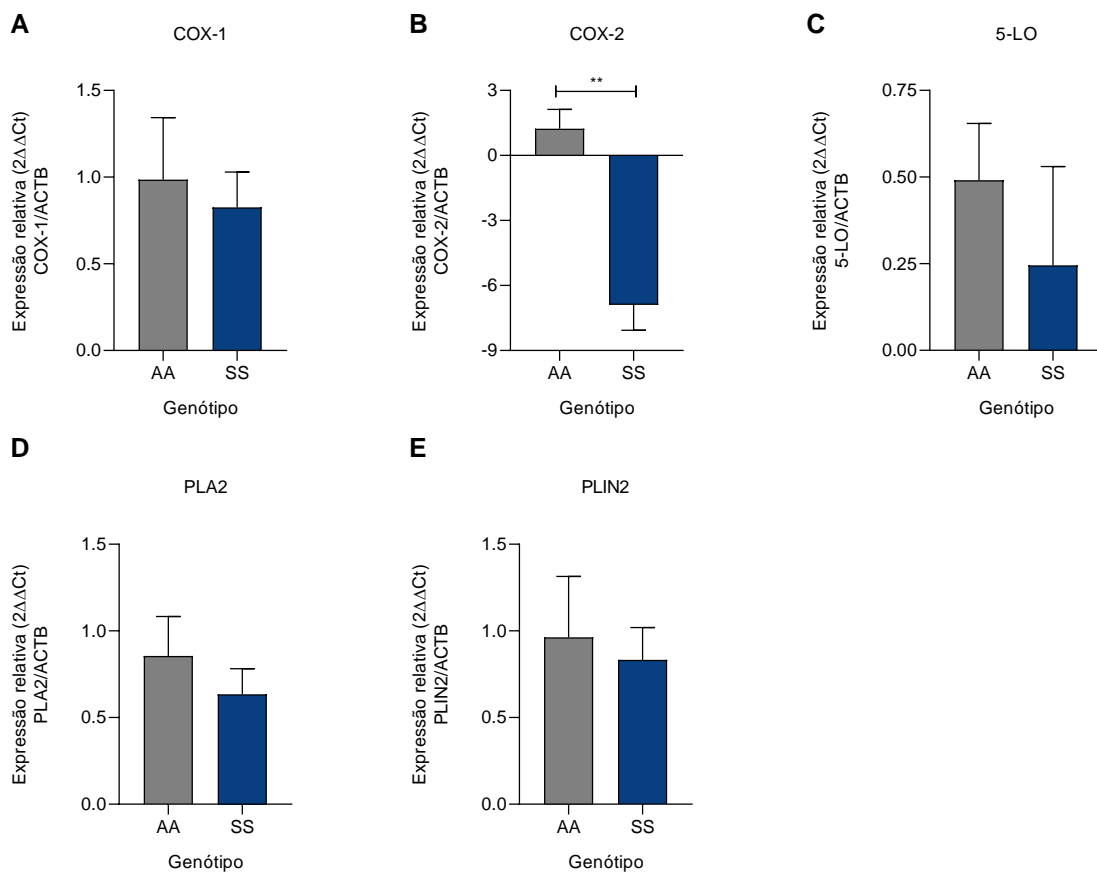
**Figura 9:** Níveis sistêmicos de prostaglandina E<sub>2</sub> e leucotrieno B<sub>4</sub> de camundongos transgênicos com traço falciforme e anemia falciforme em estado basal comparadas aos camundongos transgênicos saudios. Níveis de PGE<sub>2</sub> (A) e LTB<sub>4</sub> (B) foram dosados no soro camundongos controles (AA, barra cinza), traço falciforme (AS, barra verde) e com anemia falciforme (SS, barra azul), n = 7. Os dados estão apresentados em mediana com intervalo interquartil utilizando o teste de Kruskal-Wallis (\* $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pelo autor



### 6.1.5 Expressão de enzimas relacionadas com síntese de eicosanoides

Tendo observado diferenças níveis séricos de eicosanoides e objetivando avaliar alterações inflamatórias em um modelo de úlcera cutânea, nós avaliamos, na pele de camundongos AA e SS não estimulados, a expressão de enzimas relacionadas com a síntese de eicosanoides, incluindo COX-1, COX-2, 5-LO, PLA<sub>2</sub> e PLIN<sub>2</sub>. Dentre as enzimas, apenas a COX-2 apresentou expressão significativamente reduzida no grupo SS (figura 10B). Apesar da PGE<sub>2</sub> ser produzida pela COX-2 e seu nível sérico estar elevado, a expressão da enzima no tecido epitelial não acompanhou o aumento sistêmico desse prostanóide, no entanto, este evento precisa ser melhor investigado. Quanto a expressão dos demais genes, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.



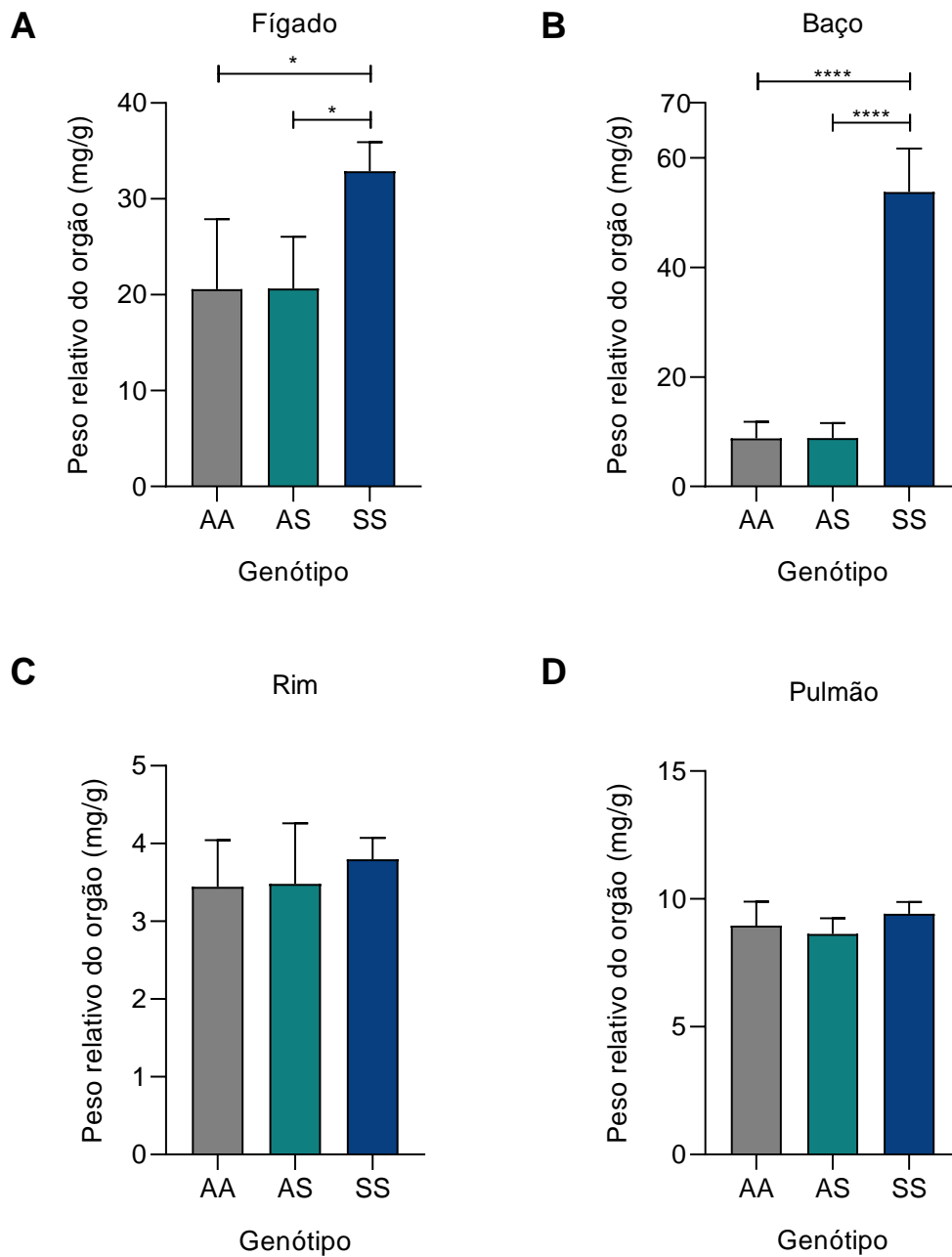
**Figura 10** - Expressão de enzimas relacionadas com a síntese de eicosanoides na pele camundongos transgênicos com anemia falciforme em estado basal comparadas aos camundongos transgênicos saudáveis. **Expressão relativa (2<sup>-ΔΔCt</sup>) dos genes da COX-1 (A), COX-2 (B), 5-LO (C), PLA<sub>2</sub> (D) e PLIN<sub>2</sub> (E) avaliadas de fragmento de pele de camundongos controles (AA, barra cinza) e camundongos com anemia falciforme (SS, barra azul), n=5. Os dados estão apresentados em mediana com intervalo interquartil utilizando o teste de Kruskal-Wallis (\*\* p < 0,01).**

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 6.1.6 Peso relativo dos órgãos

Além das análises descritas anteriormente, foi avaliado o peso relativo de órgãos como fígado, baço, rins e pulmão dos grupos AA, AS e SS, uma vez que macroscopicamente apresentaram-se com tamanho alterado. O peso relativo foi calculado dividindo a massa do órgão (mg) pelo peso do animal (g) e mostrado na figura 11.

Os animais SS apresentaram fígado com tamanho e peso aumentados quando comparados aos demais grupos (figura 11A). Já o baço foi o órgão que apresentou mais diferença, com peso relativo cerca de 6 vezes maior que os demais animais (figura 11B). Esses dados, juntos com os resultados das alterações bioquímicas (figura 8), sugerem que a AF leva a alterações funcionais e estruturais, uma vez que a fisiopatologia da doença possui relação com esses órgãos. O peso dos demais órgãos não apresentou diferença estatisticamente significativa.

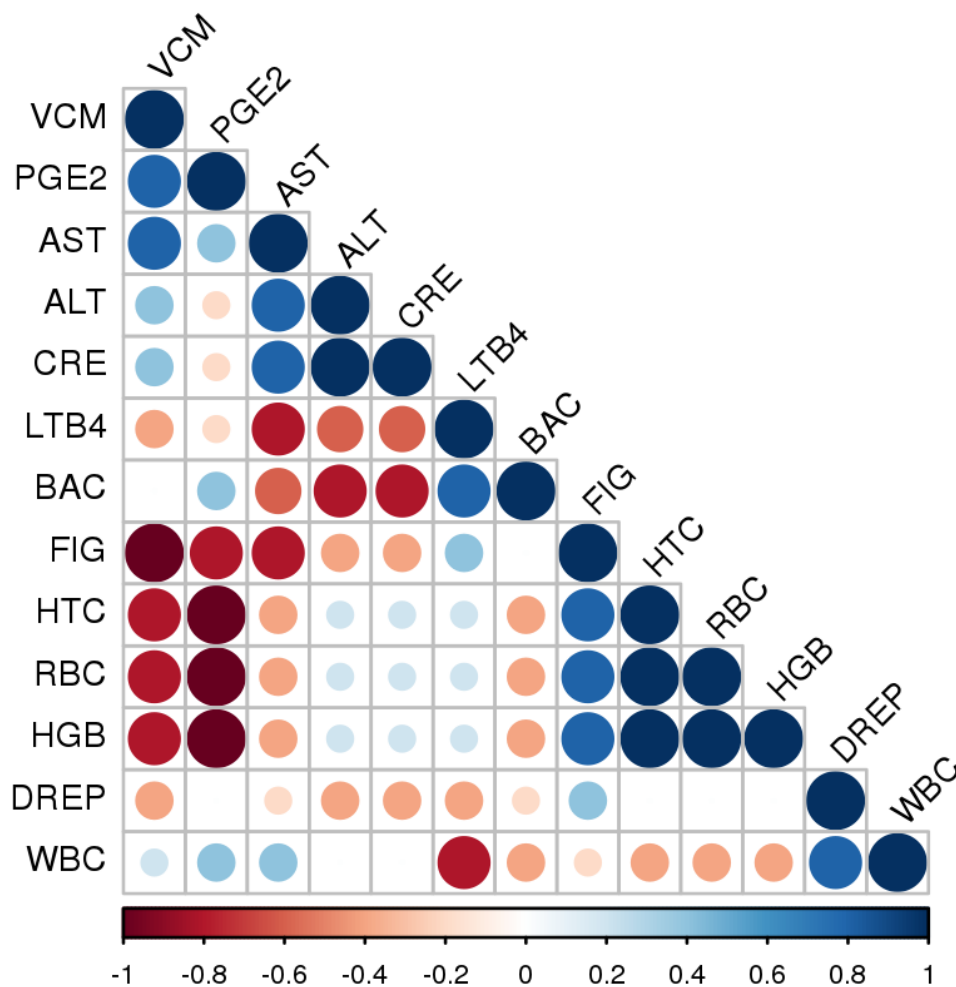


**Figura 11 - Peso relativo dos órgãos de camundongos transgênicos com traço falciforme e anemia falciforme em estado basal comparadas aos camundongos transgênicos saudáveis.** Peso relativo do fígado (A), baço (B), rim (C) e pulmão (D) foram calculados de camundongos controles (AA, barra cinza), traço falciforme (AS, barra verde) e com anemia falciforme (SS, barra azul), n=5. Os dados estão apresentados em mediana com intervalo interquartil utilizando o teste de Kruskal-Wallis (\*p < 0,05).

**Fonte:** Elaborado pelo o autor

### 6.1.7 Correlação entre principais resultados

Com intuito de associar os principais parâmetros alterados em estado basal, os principais resultados foram analisados por correlação de Spearman e mostrados na figura 12. Como principal achado temos os marcadores de anemia (hemoglobina, hematócrito e hemácias totais) com correlação negativa forte entre os níveis de PGE<sub>2</sub> ( $r=-1$ ), sugerindo que quanto mais grave o quadro anêmico dos animais, maiores os níveis desse eicosanoide. Além disso, outras correlações corroboram com a fisiopatologia da doença, como a correlação positiva entre drepanócitos e leucócitos, células que participam do processo vaso-oclusivo.



**Figura 12 - Matriz de correlação entre os principais resultados da caracterização basal.** Matriz de correlação de Spearman entre os resultados da caracterização basal. As cores representam o direcionamento das correlações, com intensidade da cor vermelha associada à uma correlação negativa e azul com correlação positiva. ALT = alanina aminotransferase; AST = alanina aminotransferase; BAC = Tamanho do baço; CRE = creatinina; DREP = drepanócitos; FIG = Tamanho do fígado; HGB = hemoglobina; HTC = hematócrito; LTB<sub>4</sub> = leucotrieno B<sub>4</sub>; PGE<sub>2</sub> = prostaglandina E<sub>2</sub>; PLT = plaquetas totais; RBC = hemácias totais (do inglês *red blood cell*); VCM = volume corpuscular médio; WBC = leucócitos totais (do inglês *White blood cell*).

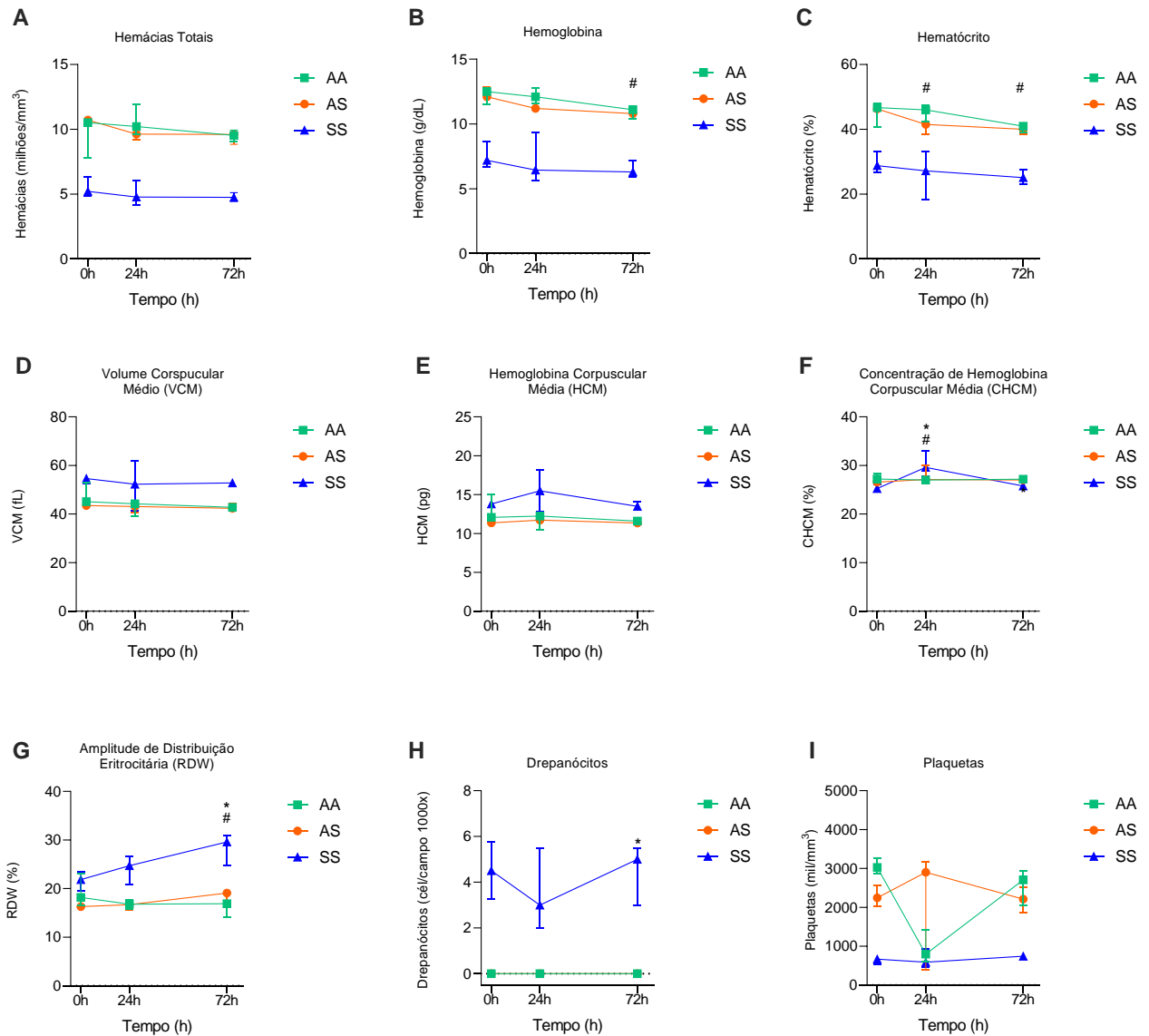
**Fonte:** Elaborado pelo o autor

## 6.2 ALTERAÇÕES LOCAIS E SISTÊMICAS INDUZIDAS PELO MODELO DE ÚLCERA CUTÂNEA

### 6.2.1 Alterações no hemograma

Para avaliar o possível impacto da úlcera cutânea nos parâmetros hematológicos descritos anteriormente, amostras coletadas 24h e 72h após a indução da úlcera foram analisadas entre os grupos e em relação aos valores basais (0h) determinadas.

Dentre os parâmetros, a hemoglobina e hematócrito apresentaram redução significativa no grupo AS no tempo de 72h (figura 13B e 12C). Já o CHCM apresentou aumento no tempo de 24h nos grupos AS e SS (figura 13F) e o RDW se elevou em 72h nos mesmos grupos (figura 13G). Os demais parâmetros permaneceram sem alterações significativas em relação aos valores basais.



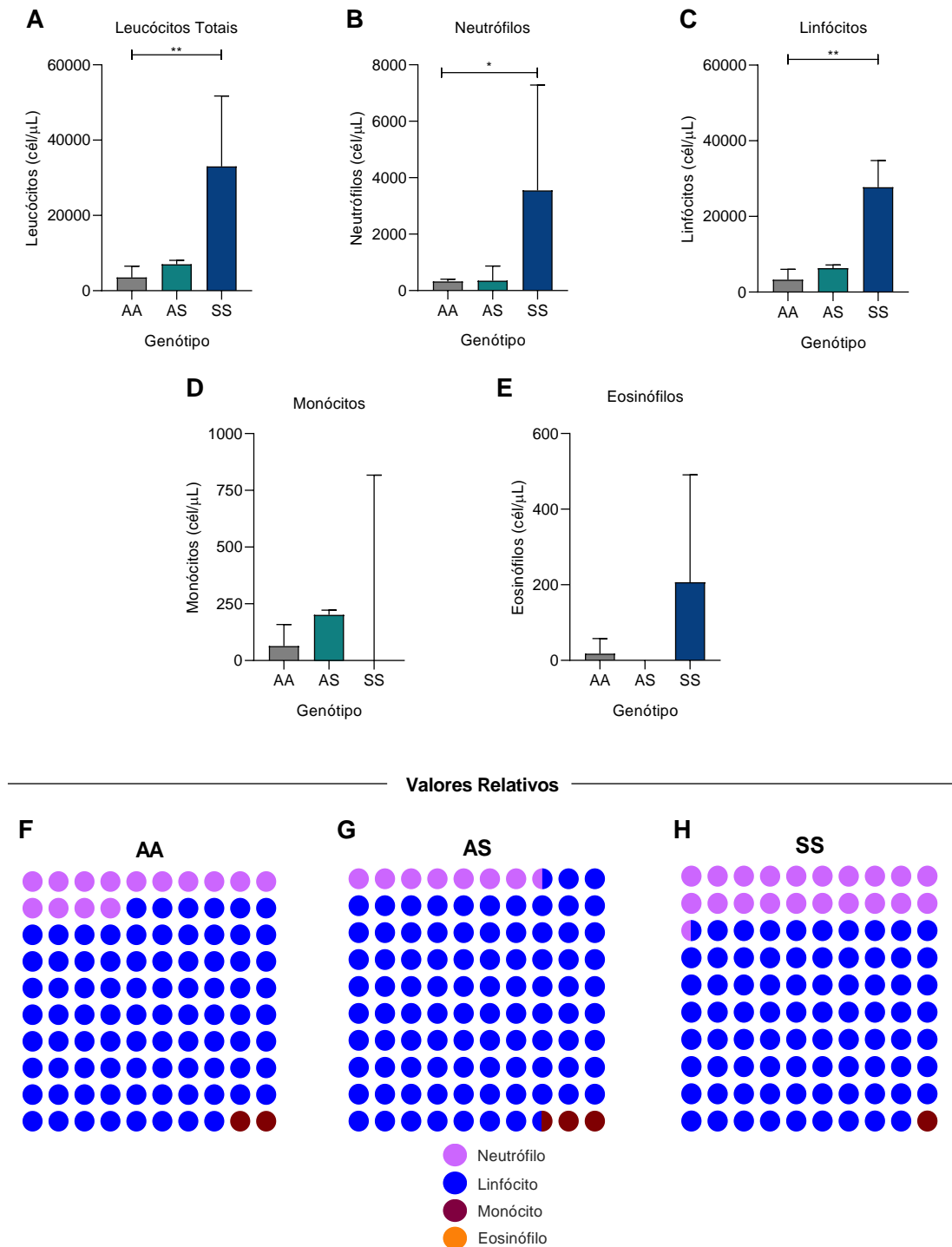
**Figura 13 - Alterações do hemograma 24h e 72h após a indução da úlcera comparados aos valores basais.** Valores absolutos de hemácias totais (A), hemoglobina (B), hematócrito (C), VCM (D), HCM (E), CHCM (F), RDW (F), drepanócitos (H) e plaquetas (I) foram quantificados no sangue total de camundongos controles (AA, quadrado verde), traço falciforme (AS, círculo laranja) e com anemia falciforme (SS, triângulo azul), em 24h (n=5) e em 72h (n=6). Os dados estão apresentados em mediana com intervalo interquartil utilizando o teste de Kruskal-Wallis (#  $p < 0,05$  entre AS 0h e AS 24h ou 72h; \*  $p < 0,05$  entre SS 0h e SS 24h ou 72h).

**Fonte:** Elaborado pelo o autor

## 6.2.2 Alterações no leucograma

Ainda no mesmo contexto, comparamos os valores absolutos do leucograma entre os grupos após 24h (figura 14) e 72h (figura 15) da indução da úlcera. Em 24h, a quantidade de leucócitos totais no grupo SS permaneceu maior quando comparado ao AA (figura 14A), assim como os valores de neutrófilos (14B) e linfócitos (14C), ambos com diferença estatística

significante. As diferenças entre os números de monócitos (figura 14D) e de eosinófilos (figura 14E) dos grupos não apresentaram significância estatística.

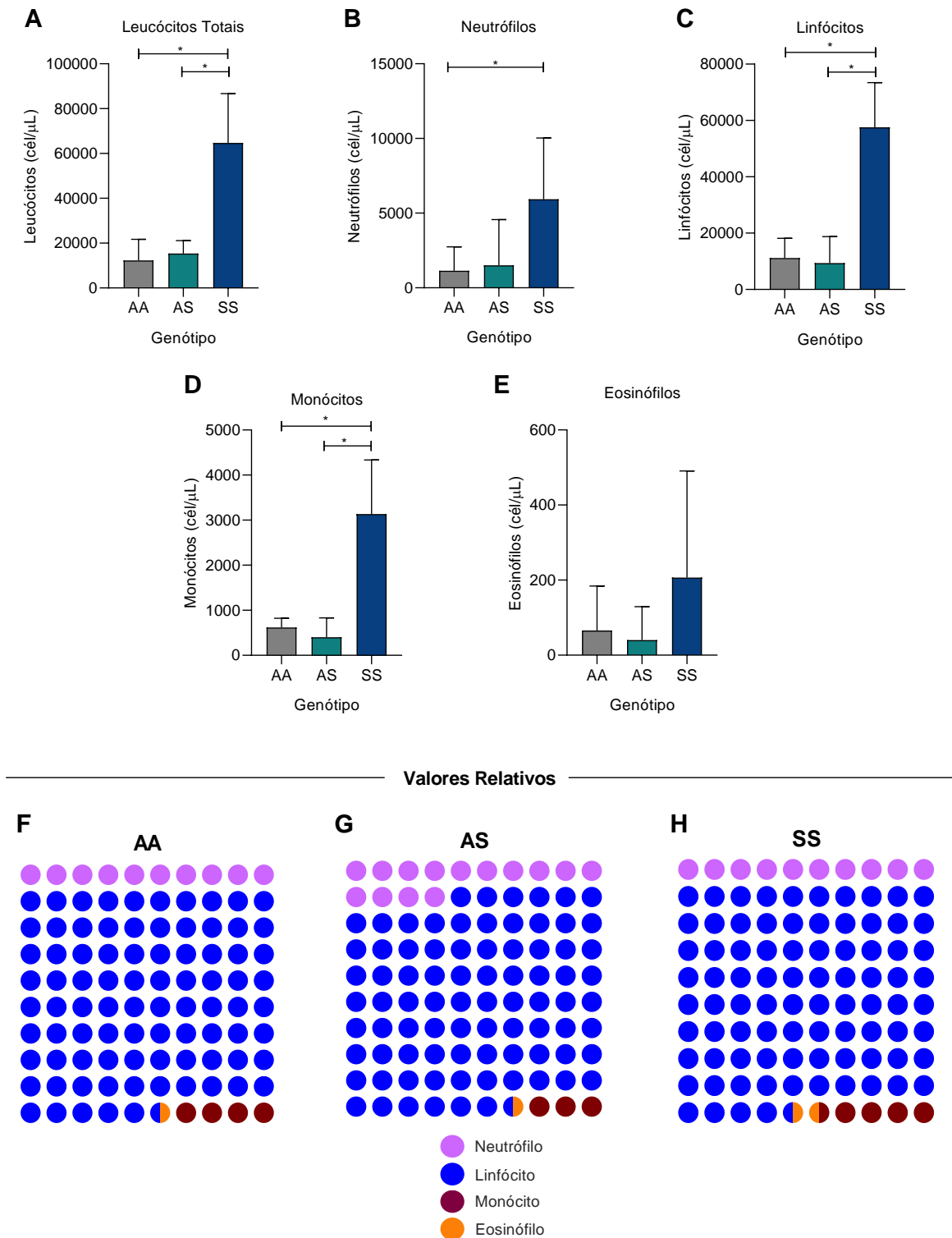


**Figura 14 - Leucograma dos camundongos com traço falciforme e anemia falciforme 24h após indução da úlcera comparados com os camundongos sadios.** Valores absolutos de leucócitos totais (A), neutrófilos (B), linfócitos (C), monócitos (D) e de eosinófilos (E), e seus respectivos valores relativos (F, G e H) foram quantificados no sangue total de camundongos controles (AA, barra cinza), traço falciforme (AS, barra verde) e com anemia falciforme (SS, barra azul), n = 5. Os dados estão apresentados em mediana com intervalo interquartil utilizando o teste de Kruskal-Wallis (\*p < 0,05).

**Fonte:** Elaborado pelo o autor

Já em relação aos valores de 72h, o grupo SS apresentou diferença significativa na quantidade absoluta de leucócitos totais (figura 15A), linfócitos (figura 15C) e monócitos (figura 15D) em relação ao AA e AS. Além disso, o mesmo grupo apresentou uma maior quantidade de neutrófilos (figura 15B) quando comparado ao grupo AA. Já os eosinófilos também permaneceram elevados no SS, no entanto sem diferença significativa (figura 15E).

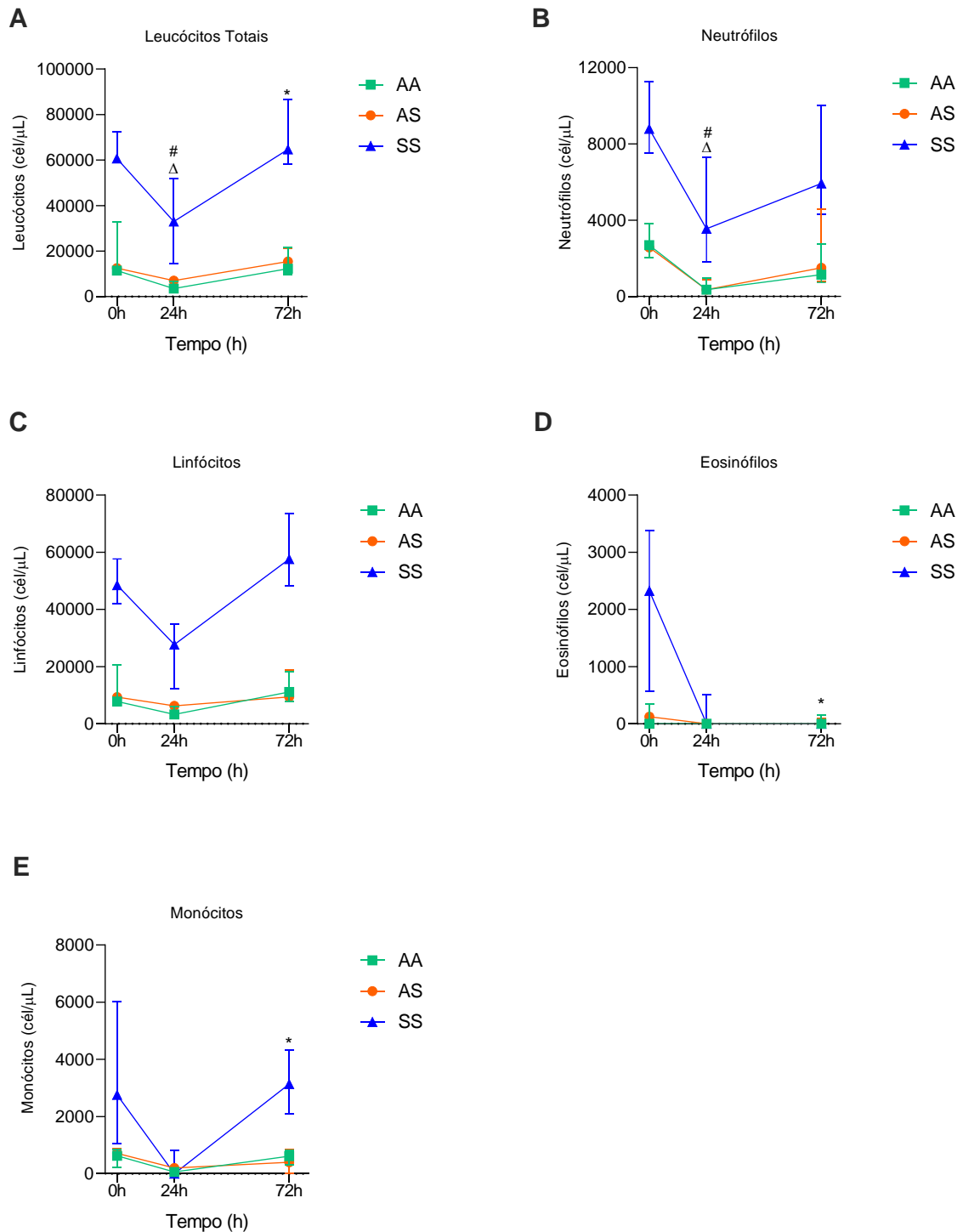




**Figura 15 - Leucograma dos camundongos com traço falciforme e anemia falciforme 72h após indução da úlcera comparados com os camundongos saudáveis.** Valores absolutos de leucócitos totais (A), neutrófilos (B), linfócitos (C), monócitos (D) e de eosinófilos (E), e seus respectivos valores relativos (F, G e H) foram quantificados no sangue total de camundongos controles (AA, barra cinza), traço falciforme (AS, barra verde) e com anemia falciforme (SS, barra azul), n = 5. Os dados estão apresentados em mediana com intervalo interquartil utilizando o teste de Kruskal-Wallis (\*p < 0,05)

**Fonte:** Elaborado pelo autor

Para avaliar como a úlcera altera os valores do leucograma, comparamos os resultados basais com os resultados de 24h e 72h após a indução. Diferenças significativas foram observadas no número de leucócitos totais (figura 16A) e neutrófilos (figura 16B) entre 0h e 24h dos grupos AA e AS. Além disso, o número de leucócitos totais (16A) entre os tempos de 0h e 72h do grupo SS apresentou aumento significativo, ao mesmo tempo que as quantidades de monócitos (figura 16D) e de eosinófilos (figura 16E) apresentaram redução significativa no mesmo grupo entre 0h e 72h.



**Figura 16 - Alterações do leucograma 24h e 72h após a indução da úlcera comparadas aos valores basais.** Valores absolutos de leucócitos totais (A), neutrófilos (B), linfócitos (C), monócitos (D) e de eosinófilos (E) foram comparados entre cada grupo nos tempos de 24h e 72h (n=5). Os dados estão apresentados em mediana com intervalo interquartil utilizando o teste de Kruskal-Wallis ( $\Delta$   $p < 0,05$  entre AA 0h e AA 24h ou AA 72h; #  $p < 0,05$  entre AS 0h e AS 24h ou 72h; \*  $p < 0,05$  entre SS 0h e SS 24h ou 72h).

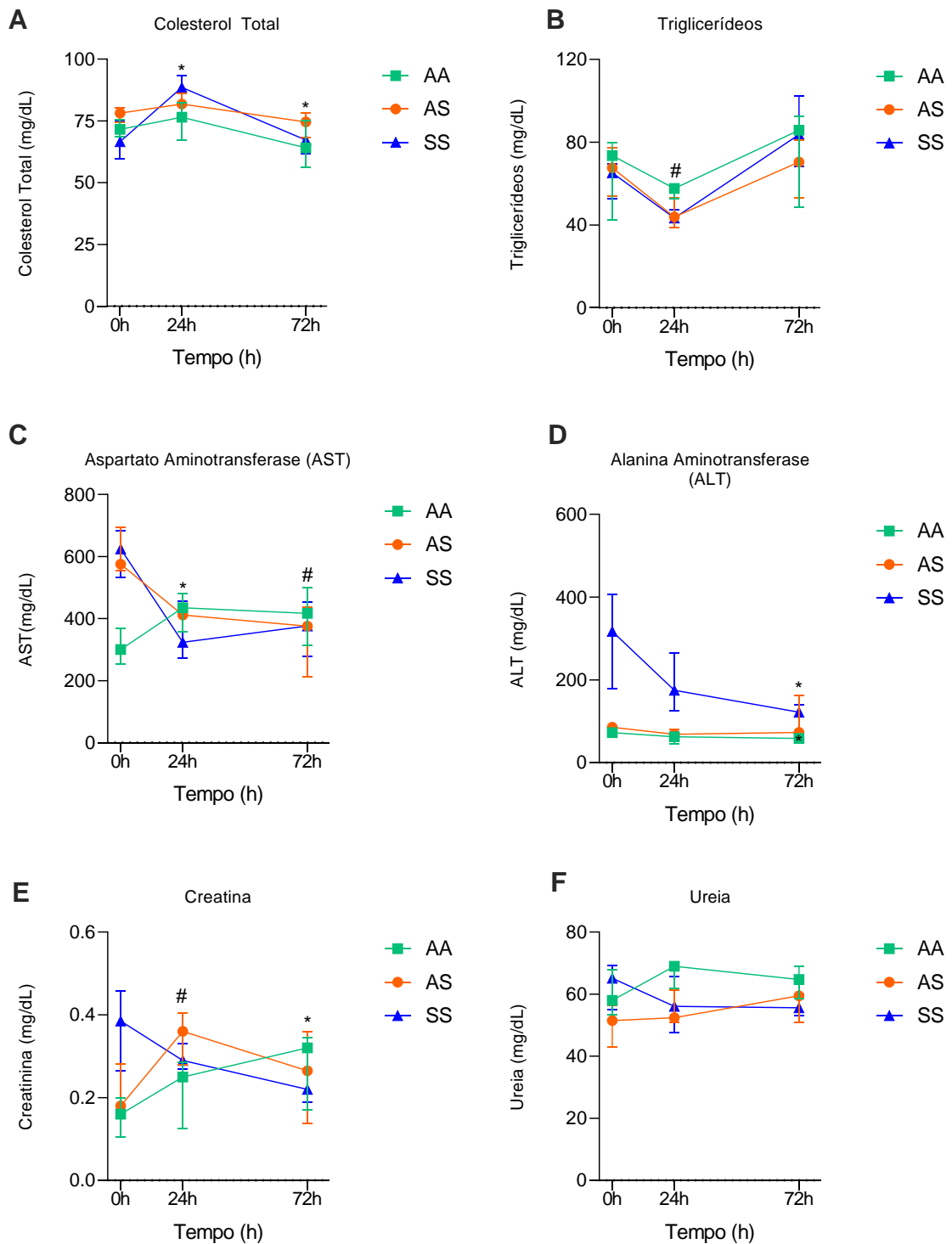
**Fonte:** Elaborado pelo o autor

### 6.2.3 Alterações nas dosagens bioquímicas

A fim de avaliar como o protocolo de úlcera cutânea altera os parâmetros bioquímicos de colesterol total, triglicerídeos, AST, ALT, creatinina e ureia, esses analitos foram dosados no soro dos grupos 24h e 72h após a indução da úlcera.

O colesterol total do grupo SS apresentou aumento em 24h e diminuição em 72h, chegando próximo ao resultado basal (figura 17A), enquanto os triglicerídeos apresentaram redução no grupo AS no tempo de 24h, ambos com diferença estatisticamente significativa.

O grupo SS apresentou diminuição da enzima AST em 24h, assim como o grupo AS em 72h (figura 17C). Já os níveis de ALT reduziram em 72h no grupo SS (figura 17D). Ainda, a creatinina sofreu alteração para mais no grupo AS em 24h e para menos no grupo SS em 72h (figura 17E). Todas essas diferenças apresentaram significância estatística, enquanto as alterações nos níveis de ureia não foram estatisticamente significantes.



**Figura 17 - Alterações das dosagens bioquímicas 24h e 72h após a indução da úlcera comparadas aos valores basais.** Níveis de Colesterol total (A), Triglicerídeos (B), AST (C), ALT (D), Creatinina (E) e Ureia (F) foram quantificados no soro de camundongos controles (AA, quadrado verde), traço falciforme (AS, círculo laranja) e com anemia falciforme (SS, triângulo azul) coletado 24h e 72h após a indução da úlcera, e comparados entre os grupos e os tempos, n=5. Os dados estão apresentados em mediana com intervalo interquartil utilizando o teste de Kruskal-Wallis (# p < 0,05 entre AS 0h e AS 24h ou 72h; \* p < 0,05 entre SS 0h e SS 24h ou 72h).

**Fonte:** Elaborado pelo o autor

### 6.2.4 Alterações nos níveis séricos de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub>

Os mediadores PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> foram dosados nas amostras coletadas 24h e 72h a fim de verificar se a indução de úlcera cutânea altera a produção desses mediadores de forma sistêmica, e se há diferença na produção entre os grupos. Os grupos AA e AS apresentaram aumento nos níveis de PGE<sub>2</sub> no tempo 24h e redução no tempo 72h, enquanto o SS apresentou diminuição nos níveis séricos deste mediador no tempo 24h e um leve aumento em 72h (figura 18A). No entanto, todas essas alterações não apresentaram significância estatística.

Da mesma forma, foram observadas alterações nos níveis de LTB<sub>4</sub>. Todos os grupos apresentaram redução no tempo 24h e aumento no tempo 72h (figura 18B), contudo essas alterações não apresentaram significância estatística.

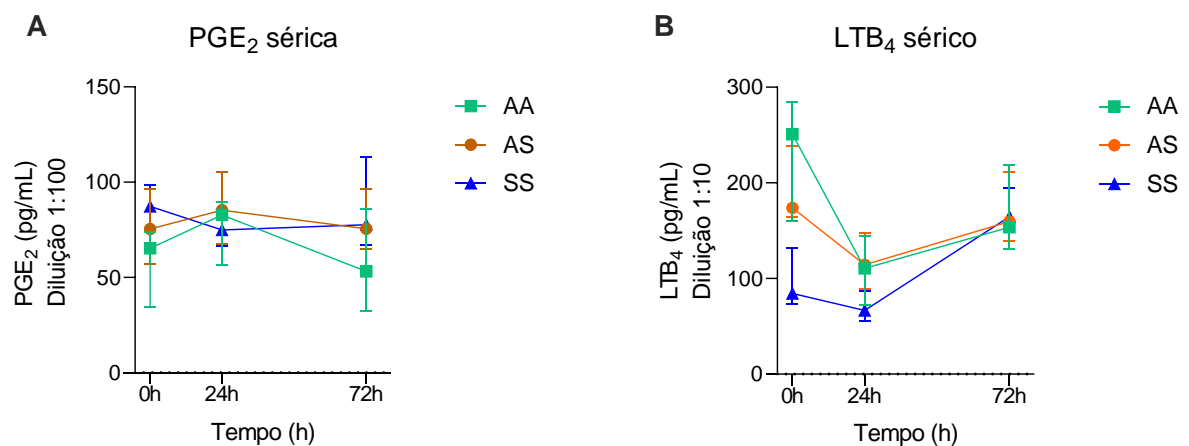


Figura 18: Alterações nos níveis sistêmicos de prostaglandina E<sub>2</sub> e leucotrieno B<sub>4</sub> após 24h e 72h da indução úlcera em camundongos com traço falciforme e anemia falciforme comparados com os camundongos sadios. **Níveis de PGE<sub>2</sub> (A) e LTB<sub>4</sub> (B) foram dosados no soro camundongos controles (AA, quadrado verde), traço falciforme (AS, círculo laranja) e com anemia falciforme (SS, triângulo azul) coletado 24h e 72h após a indução da úlcera, e comparados entre os grupos e os tempos, n = 7.**

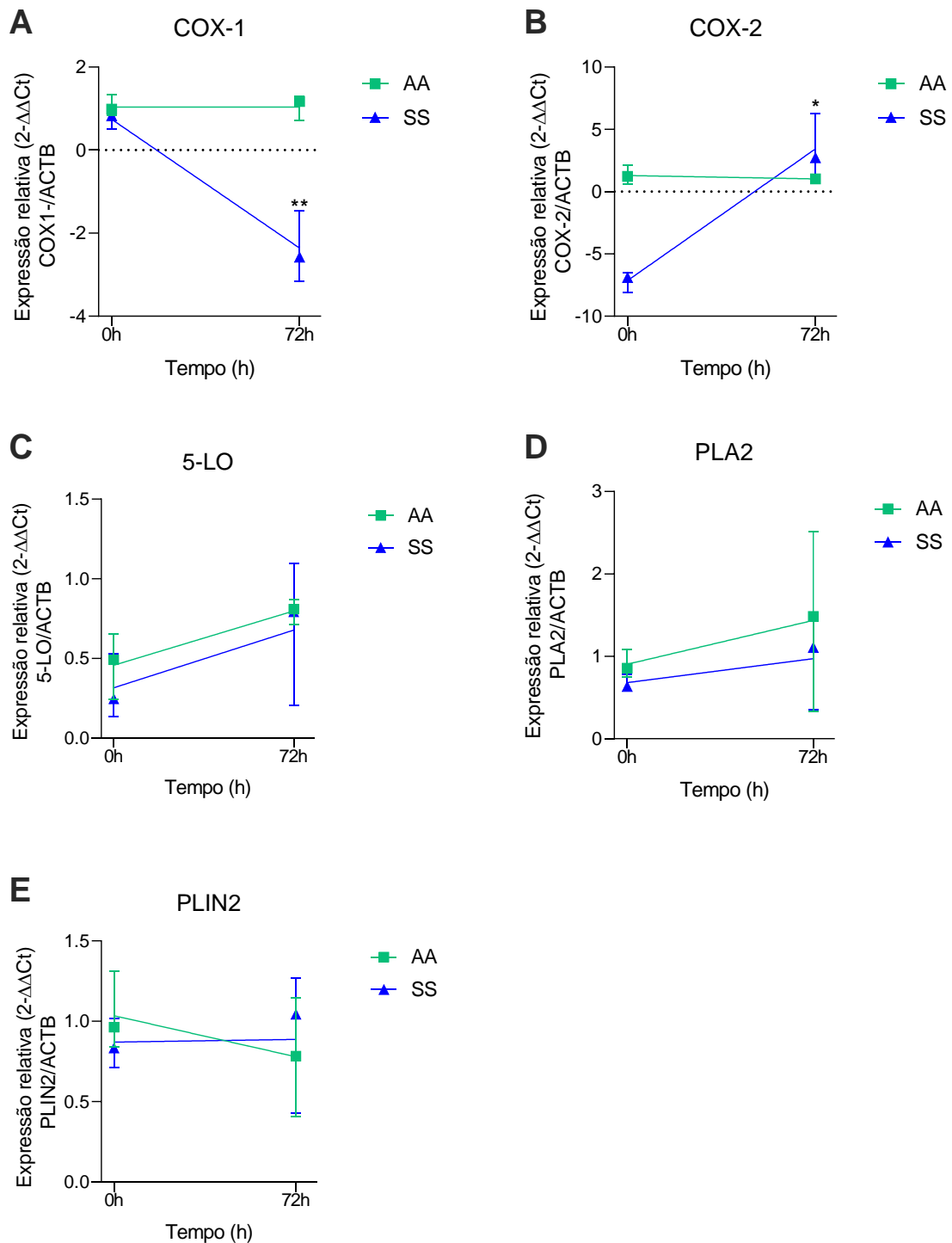
Fonte: Elaborado pelo o autor

### 6.2.5 Alterações na expressão de enzimas associadas à síntese de eicosanoides

A fim de avaliar como a úlcera altera a expressão das mesmas enzimas citadas anteriormente, e como o processo inflamatório associado afeta animais saudáveis e falcêmicos, comparamos a expressão destas enzimas nos tempos 0h (basal) e 72h após a indução da úlcera.

Dentre as enzimas analisadas, a COX-1 teve uma diminuição na sua expressão no grupo SS, à medida que a COX-2 teve um aumento na expressão no mesmo grupo, ambas com

significância estatística quando comparados a expressão basal (figura 19A e 19B) e a expressão do grupo controle em 72h (figura 19A e 19B). As demais enzimas não apresentaram diferença estatisticamente significativa.



**Figura 19** - Alterações na expressão de enzimas relacionadas com a síntese de eicosanoides no tecido da úlcera após 72h da indução em camundongos com anemia falciforme comparados com os camundongos sadios. **Expressão relativa (2- $\Delta\Delta$ Ct) dos genes da COX-1 (A), COX-2 (B), 5-LO (C), PLA<sub>2</sub> (D) e PLIN<sub>2</sub> (E) dos fragmentos das úlceras de camundongos controles (AA, quadrado verde) e camundongos com anemia falciforme (SS, triângulo azul) após 72h da indução comparados aos valores basais, n=5. Os dados estão**

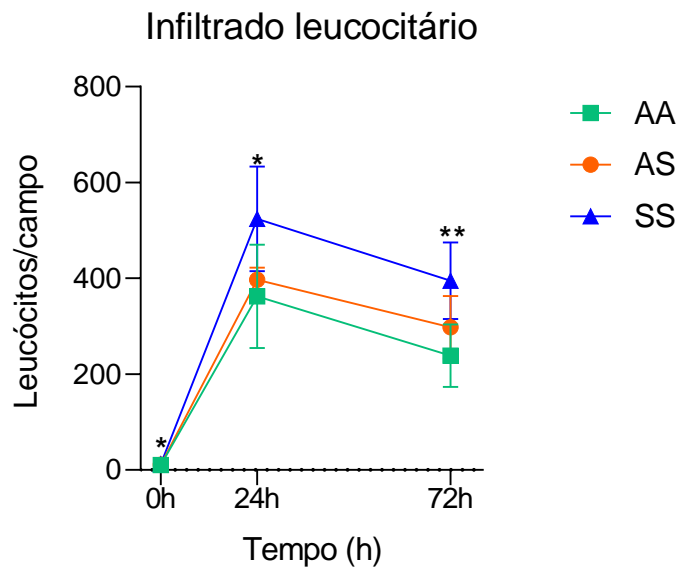
apresentados em mediana com intervalo interquartil utilizando o teste de Kruskal-Wallis (\*  $p < 0,05$  entre SS 0h e SS 72h; \*\*  $p < 0,01$  entre SS 0h e SS 72h).

Fonte: Elaborado pelo o autor

### 6.2.6 Análise do infiltrado inflamatório

Para avaliar se o infiltrado leucocitário associado ao quadro inflamatório na lesão cutânea de animais com AF é maior do que em animais sem AF, quantificamos e comparamos os leucócitos presentes na pele dos 3 grupos antes e depois da indução da úlcera nos tempos de 24h e 72h (figura 20).

Em estado basal, os animais com AF apresentam uma maior quantidade de leucócitos no tecido que os demais grupos. No tempo 24h após a indução, há um aumento das células no tecido em todos os grupos, no entanto o grupo SS apresenta um infiltrado estatisticamente significativo maior que o grupo AA. Já em 72h após a indução, a quantidade de células cai em todos os grupos, porém a diferença significativa entre o grupo AA e SS permanece.

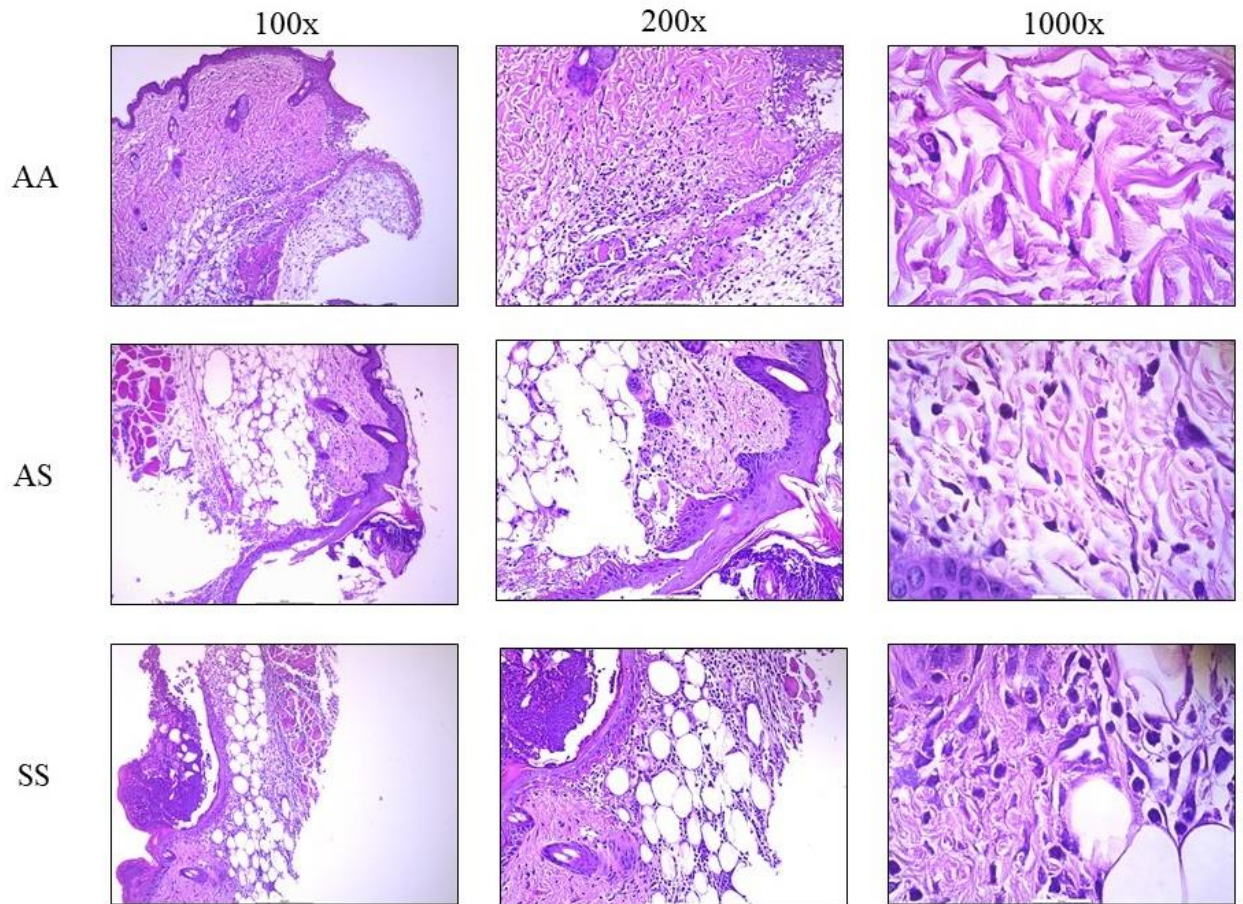


**Figura 20 - Infiltrado leucocitário na pele íntegra de camundongos com traço falciforme e anemia falciforme comparados com os camundongos sadios, comparados com o infiltrado de 24h e 72h após a indução da úlcera.** Leucócitos foram quantificados em 10 campos na pele íntegra e no tecido da úlcera coletado 24h e 72h após a indução em camundongos controles (AA, quadrado verde), traço falciforme (círculo laranja) e com anemia falciforme (SS, triângulo azul),  $n=6$ . Os dados estão apresentados em média e desvio padrão utilizando o teste One-Way ANOVA (\*  $p < 0,05$  entre AA e SS; \*\*  $p < 0,01$  entre AA e SS).

Fonte: Elaborado pelo o autor

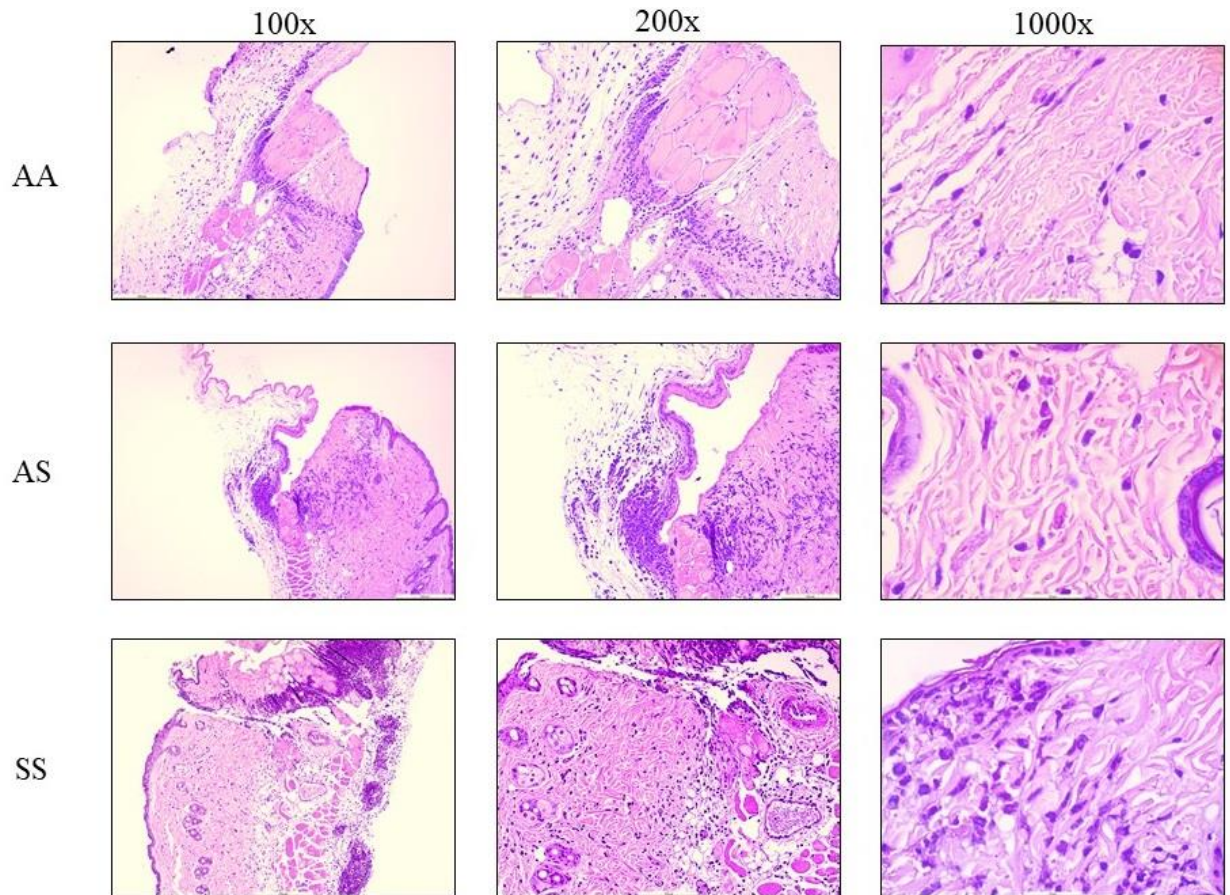


Nas figuras 21 e 22 são mostradas imagens representativas do infiltrado leucocitário dos cortes histológicos de 24h e 72h após indução da úlcera, respectivamente, no grupo AA, AS e SS na objetiva de 100x, 200x e 1000x. É possível observar que o grupo SS apresenta um maior infiltrado leucocitário, corroborando com os dados da figura 20.



**Figura 21 - Cortes histológicos representativos do infiltrado leucocitário após 24h da indução da úlcera.** Os cortes histológicos foram corados com H&E e as fotografias foram tiradas com o microscópio Leica DMI8 em aumentos de 100x, 200x e 1000x.

**Fonte:** Elaborado pelo o autor



**Figura 22 - Cortes histológicos representativos do infiltrado leucocitário após 72h da indução da úlcera.** Os cortes histológicos foram corados com H&E e as fotografias foram tiradas com o microscópio Leica DMI8 em aumentos de 100x, 200x e 1000x

**Fonte:** Elaborado pelo o autor

## 7 DISCUSSÃO

A AF é a hemoglobinopatia mais frequente e com maior impacto social no mundo, com altas taxas de morbimortalidade (PINTO et al., 2019). As opções de tratamento atuais para a doença se baseiam principalmente na terapia de suporte ao paciente e na utilização da hidroxiureia. No entanto, o efeito terapêutico deste fármaco varia entre indivíduos, e os efeitos colaterais associados ao seu uso, especialmente em longo prazo, são graves., contribuindo para a subutilização do fármaco, o que tem estimulado a busca por novas opções terapêuticas (MCGANN; WARE, 2015; TISDALE; THEIN; EATON, 2020). Nesse contexto, modelos murinos humanizados para anemia falciforme podem ser usados para melhor compreensão da fisiopatologia e complicações desta doença, bem como para a pesquisa de novas terapias (NAGEL, 1998).

O presente estudo utilizou camundongos da linhagem Townes, que vem sendo utilizada por diversos para o estudo experimental da AF (CHANTRATHAMMACHART et al., 2012; CHARRIN et al., 2016; NGUYEN et al., 2014). Inicialmente buscou-se caracterizar laboratorialmente cada um dos 3 genótipo dos animais, AA (sadios), AS (com traço falciforme) e SS (falciformes). Os parâmetros de hemograma e de leucograma são bons marcadores para verificar alterações sistêmicas de diversas doenças. Nossos resultados indicaram que os animais com AF apresentam uma anemia hemolítica grave devido aos baixos níveis de hemácias totais, hemoglobina e hematócrito, além da presença dos drepanócitos na corrente sanguínea e amplitude de distribuição eritrocitária elevada. O grupo com traço falciforme (AS) apresentou resultados semelhantes ao grupo controle. Todos esses resultados corroboram com a caracterização hematológica do mesmo modelo murino realizada por Nguyen et al. (2014), que obtiveram resultados semelhantes com relação a estes parâmetros.

O leucograma de animais SS apresentou leucocitose extrema, além de neutrofilia e linfocitose, corroborando com estudos realizados em humanos. O aumento de leucócitos totais circulantes está associado à gravidade e ao risco de morte em pacientes com AF (PLATT et al., 1994), uma vez que essas células desempenham um papel importante na fisiopatologia da doença, interagindo com drepanócitos, plaquetas e com o endotélio, promovendo o processo vaso-oclusivo e inflamação. Ademais, o heme liberado durante a hemólise dos drepanócitos estimula a formação de NETs pelos neutrófilos (CHEN et al., 2014; ZHANG et al., 2016), contribuindo com o quadro inflamatório gerado pela AF.

Em contraste com pacientes com AF que apresentam trombocitose, a contagem de plaquetas apresentou-se diminuída no grupo SS em nosso estudo, no entanto esse achado

também foi visto por Charrin et al. (2016) no mesmo modelo murino. Essa diminuição pode estar relacionada com a presença de coágulos nas amostras de sangue total. Dessa maneira, os resultados sugerem que o modelo Townes de AF mimetiza a doença hemolítica humana, uma vez que pacientes com AF possuem alterações no hemograma e leucograma semelhantes (ALKINDI; ALMUFARGI; PATHARE, 2020; SANT'ANA et al., 2017) às encontrados em nosso estudo.

Considerando a AF como uma doença com alterações sistêmicas (PINTO et al., 2019), dosamos níveis de colesterol total, triglicérides, marcadores de alterações hepáticas (AST e ALT) e renais (ureia e creatinina). O grupo SS apresentou valores elevados de AST, ALT e creatinina, e o grupo AS nível elevado de AST. Juntamente com essas alterações dos marcadores hepáticos, observamos hepatomegalia e esplenomegalia. Estudos semelhantes, como o de Charrin et al. (2016) e de Szczepanek et al. (2012), encontraram os mesmo achados macroscópicos do fígado e baço de modelos murinos com AF. Sabe-se que pacientes com AF também apresentam complicações hepáticas causadas, principalmente, pela processo vaso-oclusivo nos vasos hepáticos, que culminam em dano, infarto tecidual, hepatomegalia, e elevação de AST e ALT (EBERT; NAGAR; HAGSPIEL, 2010; THEOCHARIDOU; SUDDLE, 2019), corroborando com nossos dados. Além disso, as complicações vasculares também afetam os glomérulos e túbulos renais, podendo causar infarto e necrose renal (GARGIULO et al., 2014), o que pode justificar a elevação sérica da creatinina.

Considerando o estado inflamatório causado pela AF e a relação que a inflamação possui com eicosanoides, buscamos comparar os níveis séricos PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> entre os animais dos diferentes fenótipos. Nossos dados mostraram níveis elevados de PGE<sub>2</sub> nos camundongos falcêmicos. Na literatura, não foram encontrados estudos relacionados a esse eicosanoide em modelo murino de AF. No entanto, estudos relatam aumento nos níveis de citocinas e mediadores inflamatórios, incluindo a PGE<sub>2</sub>, em pacientes com AF (GRAIDO-GONZALEZ et al., 1998; LANARO et al., 2009). Esse prostanoide possui ação dependente do tipo do receptor ao qual se liga (SUGIMOTO; NARUMIYA, 2007), e embora seja considerado um mediador pró-inflamatório, na AF pode trazer efeitos benéficos ou prejudiciais a depender do contexto do estudo. Por um lado, Datta (1985) demonstrou a capacidade da PGE<sub>2</sub> em estimular a produção de HbF. A HbF age diminuindo a polimerização das hemácias falciformes com consequente diminuição de crises vaso-oclusivas e inflamação (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Por outro lado, a PGE<sub>2</sub> demonstrou ser capaz de gerar alterações vasculares inflamatórias, hiperalgesia (MEDZHITOV, 2008) e estimular a diferenciação de linfócitos Th1 via receptores EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub> (KAWAHARA et al., 2015), contribuindo com o processo

inflamatório na AF a partir da produção de TNF- $\alpha$  e de INF- $\gamma$  por esses linfócitos (RAPHAEL et al., 2015).

Ao contrário do PGE<sub>2</sub>, o mediador LTB<sub>4</sub> apresentou-se diminuído no grupo falciforme. Da mesma forma, na literatura não há estudos com dosagens desse mediador no soro de camundongos humanizados para AF. Contudo, estudos evidenciam que os níveis plasmáticos de LTB<sub>4</sub> em pacientes com AF podem estar diminuídos (IBE et al., 1994) ou aumentados (SETTY; STUART, 2002), a depender do estado dos pacientes. Embora o LTB<sub>4</sub> seja um potente mediador pró-inflamatório que promove quimiotaxia de leucócitos (BRANDT; SEREZANI, 2017), Zoccal e colaboradores (2016) demonstraram em modelo de inflamação estéril que o LTB<sub>4</sub> e a PGE<sub>2</sub> podem estar desbalanceados em processos inflamatórios, e que esse desbalanço pode gerar um quadro inflamatório mais grave. Os autores evidenciaram que PGE<sub>2</sub> induz a inflamação por produção indireta de IL-1 $\beta$  a partir da ativação da via de sinalização cAMP-PKA-NF $\kappa$ B ao se ligar em receptores EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub>. De forma oposta, demonstraram que o LTB<sub>4</sub> diminui a produção de cAMP ao se ligar em receptores BLT1, com consequente redução da ativação da via cAMP-PKA-NF $\kappa$ B e do processo inflamatório. Logo, quando há um desbalanço entre esses mediadores como o encontrado em nosso estudo, o processo inflamatório pode ocorrer de forma mais agressiva.

A partir dessas alterações encontradas nos animais com AF, buscamos verificar pela primeira vez como esses parâmetros se alteram em função da lesão cutânea induzida em um modelo de úlcera falcêmica, nos tempos de 24h e 72h após a indução da lesão. As úlceras em pacientes com AF normalmente se desenvolvem nos membros inferiores, e a incidência dessa complicação é afetada por fatores demográficos, podendo chegar a afetar até 75% dos pacientes adultos com AF (MINNITI et al., 2010). Alterações nos níveis de citocinas, no hemograma e leucograma já foram observados em pacientes com desenvolvimento de úlcera (BABALOLA et al., 2021; BELISÁRIO et al., 2020)

No hemograma, não observamos alterações significativas dos parâmetros que indicam o quadro anêmico após 24h e 72h da indução da úlcera no grupo SS. No entanto, o grupo AS apresentou uma leve redução de hemoglobina em 72h e de hematócrito em 24h e 72h. Um estudo realizado por Babalola et al. (2021) descreveu que pacientes com AF e desenvolvimento de úlcera crônicas (de 1 a 22 anos) apresentam hemácias totais, hemoglobina e hematócrito diminuídos quando comparados à pacientes com AF sem úlcera. Essa diferença também já foi observada por Nolan e colaboradores (2006) em um estudo caso-controle com pacientes com úlceras com falha na cicatrização. Nos nossos dados não foram observadas tais alterações, o que pode ser explicado pelo curto tempo de desenvolvimento da úlcera.

No leucograma, apesar dos resultados do grupo SS serem maiores que os demais grupos em todos os parâmetros, em 24h após a indução houve uma redução dos leucócitos totais e aumento da contagem de leucócitos totais e monócitos desse grupo em 72h. Em contrapartida, ao analisarmos o infiltrado leucocitário do tecido após a indução da úlcera, observamos um pico em 24h e uma diminuição desse infiltrado no tempo de 72h. Considerando que no tempo de 24h o processo inflamatório tem características iniciais da inflamação, é esperado que a contagem de leucócitos seja elevada. No entanto, Takada e colaboradores (2004), sugerem que a diminuição de leucócitos da corrente sanguínea associada a um infiltrado leucocitário tecidual pode estar relacionada com o extravasamento e diapedese que ocorre nessa fase, o que pode explicar o fenômeno encontrado em nosso estudo.

Nosso estudo demonstrou a diminuição nos níveis bioquímicos de colesterol total, AST, ALT e creatinina em 24h e 72h. Curiosamente, um estudo realizado por Minniti et al. (2011) comparando esses marcadores entre pacientes com AF com úlcera e pacientes com AF sem úlcera, verificou apenas aumento no nível sérico de AST, enquanto os demais valores permaneceram sem diferenças. Santos et al. (2020) também observaram níveis maiores de AST em pacientes com úlcera falcêmica. Apesar dos nossos resultados apresentarem alterações opostas às descritas na literatura, o fato de utilizarmos o modelo experimental murino enquanto a literatura descreve esses valores em pacientes com AF pode justificar esses resultados distintos.

Já em relação às dosagens de  $PGE_2$  e  $LTB_4$ , as alterações encontradas não foram significativas após a indução da úlcera. No entanto, o estudo de Carvalho et al. (2018) demonstrou que pacientes com AF apresentam elevadas concentrações de  $PGE_2$  circulante em estado estável, e que há redução desse mediador durante episódios de crise dolorosa. Nossos resultados, apesar de não apresentarem significância estatística, também demonstraram uma redução dos níveis de  $PGE_2$  na presença da úlcera no modelo murino.

Além disso, as alterações da  $PGE_2$  encontradas se equiparam a dos leucócitos totais e neutrófilos, com uma redução em 24h e aumento em 72h. Como citado anteriormente, esses valores foram inversamente proporcionais ao de leucócitos do infiltrado inflamatório. Tendo em vista que  $PGE_2$  pode ser produzido por diversas células no corpo humano, e que o infiltrado inflamatório é uma das principais fontes de produção (KALINSKI, 2012), esses achados podem sugerir que a queda dos valores de  $PGE_2$  sérica pode ter se dado devido à diminuição de leucócitos circulantes, e que provavelmente os níveis desse mediador podem estar aumentado no tecido da úlcera, uma vez que o infiltrado e a expressão gênica da COX-2, enzima que converte o ácido araquidônico em  $PGE_2$  (CALDER, 2020), estavam elevados no tecido.

Durante a realização deste trabalho encontramos algumas dificuldades na manipulação e coleta de amostras de animais transgênicos com AF devido a fragilidade desse grupo. Alguns dos resultados demonstrados são preliminares, merecendo atenção e uma repetição dos experimentos com aumento do tamanho amostral, uma vez que são bastante promissores. Ainda, temos como perspectiva dar continuidade ao estudo a partir da caracterização basal de parâmetros não analisados, como outros mediadores lipídicos e citocinas inflamatórias, além de ensaios de úlcera em 48h.

Em termos mecanísticos, pretendemos ainda avaliar o papel do heme e de vias de sinalização associadas ao receptor TLR4 na inflamação associada à úlcera cutânea nestes animais. Uma vez caracterizada esta etapa, iremos avaliar o impacto do tratamento com inibidores do metabolismo lipídico e/ ou vias de sinalização associadas.

## 8 CONCLUSÃO

Na primeira etapa deste trabalho realizamos a caracterização de diversos parâmetros sistêmicos de animais transgênicos para a AF. Tanto em nível basal, como no modelo de úlcera cutânea, identificamos, pela primeira vez na literatura, alterações no metabolismo lipídico que podem estar correlacionadas com a resposta inflamatória de animais falcêmicos.

Animais transgênicos com anemia falciforme apresentam alterações bioquímicas e hematológicas que estão correlacionadas a um desbalanço no metabolismo lipídico e produção de eicosanoides, contribuindo para um maior estado inflamatório em nível basal.

A indução de úlcera cutânea neste modelo leva a um maior recrutamento de leucócitos nos animais doentes em comparação com os animais saudáveis e com traço falciforme, o que parece estar relacionado com as alterações bioquímicas, hematológicas e inflamatórias apresentadas por estes animais.



## REFERÊNCIAS

- ABUBAKAR, Y.; AHMAD, H. R.; FARUK, J. A. Hematological Parameters of Children with Sickle Cell Anemia in Steady and Crisis States in Zaria, Nigeria. **Annals of Tropical Pathology**, v. 10, n. 2, p. 122–115, 2019. Disponível em: <[https://www.atpjournals.org/temp/AnnTropPathol102122-6008767\\_164127.pdf](https://www.atpjournals.org/temp/AnnTropPathol102122-6008767_164127.pdf)>.
- ALELUIA, M. M. et al. Association of classical markers and establishment of the dyslipidemic sub-phenotype of sickle cell anemia. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2017.
- ALESSANDRI, A. L. et al. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 189–212, 2013.
- ALKINDI, S.; ALMUFARGI, S. S.; PATHARE, A. Clinical and laboratory parameters, risk factors predisposing to the development of priapism in sickle cell patients. **Experimental Biology and Medicine**, v. 245, n. 1, p. 79–83, 2020.
- ANTWI-BOASIAKO, C. et al. Hematological parameters in Ghanaian sickle cell disease patients. **Journal of Blood Medicine**, v. 9, p. 203–209, 2018.
- ANTWI-BOASIAKO, C. et al. A study of the geographic distribution and associated risk factors of leg ulcers within an international cohort of sickle cell disease patients: the CASiRe group analysis. **Annals of Hematology**, v. 99, n. 9, p. 2073–2079, 2020.
- ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, n. 1, p. 385–406, 1 dez. 2012.
- ATAGA, K. I.; KEY, N. S. Hypercoagulability in sickle cell disease: new approaches to an old problem. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2, p. 91–96, 2007.
- BABALOLA, O. A. et al. Haematological indices of sickle cell patients with chronic leg ulcers on compression therapy. **African Journal of Laboratory Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2021.
- BARABINO, G. A.; PLATT, M. O.; KAUL, D. K. Sickle cell biomechanics. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 12, p. 345–367, 2010.
- BELINI JUNIOR, E. et al. Severity of Brazilian sickle cell disease patients: Severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 54, n. 4, p. 321–327, 2015.
- BELISÁRIO, A. R. et al. Association between inflammatory molecules, nitric oxide metabolites and leg ulcers in individuals with sickle cell anemia. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, n. x x, 2020.
- BENNETT, J. M. et al. Inflammation–Nature’s Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing “the Epidemic” of Chronic Diseases. **Frontiers in Medicine**, v. 5, 27 nov. 2018.
- BIRINGER, R. G. The enzymology of human eicosanoid pathways: the lipoxygenase branches. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 9, p. 7189–7207, 2020.

- BORTOLOTTI, M. et al. Liver damage and sickle cell disease: genotype relationship. **Annals of Hematology**, v. 99, n. 9, p. 2065–2072, 2020.
- BRANDT, S. L.; SEREZANI, C. H. Too much of a good thing: How modulating LTB 4 actions restore host defense in homeostasis or disease. **Seminars in Immunology**, v. 33, n. 1, p. 37–43, 2017.
- BRASIL, M. D. S. **Condutas básicas para tratamento**. [s.l: s.n.].
- BROCK, T. G.; PETERS-GOLDEN, M. Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. **The Scientific World Journal**, v. 7, p. 1273–1284, 2007.
- BUNN, H. F. Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 762–769, 1997.
- CALDER, P. C. Eicosanoids. **Essays biochemistry**, v. 64, n. 3, p. 423–441, 2020.
- CARVALHO, M. O. S. et al. Inflammatory mediators in sickle cell anaemia highlight the difference between steady state and crisis in paediatric patients. **British Journal of Haematology**, v. 182, n. 6, p. 933–936, set. 2018.
- CHANTRATHAMMACHART, P. et al. Tissue factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse model of sickle cell disease. **Blood**, v. 120, n. 3, p. 636–646, jul. 2012.
- CHARRIN, E. et al. Inflammatory and oxidative stress phenotypes in transgenic sickle cell mice. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 62, p. 13–21, 2016.
- CHEN, G. et al. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. **Blood**, v. 123, n. 24, p. 3818–3827, 2014.
- CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 23 jan. 2018.
- CHIANG, E. Y.; FRENETTE, P. S. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 19, n. 5, p. 771–784, 2005.
- CHIURCHIÙ, V.; LEUTI, A.; MACCARRONE, M. Bioactive lipids and chronic inflammation: Managing the fire within. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JAN, 2018.
- DATTA, M. C. Prostaglandin E2 mediated effects on the synthesis of fetal and adult hemoglobin in blood erythroid bursts. **Prostaglandins**, v. 29, n. 4, p. 561–577, 1985.
- DEBAUN, M. R.; KIRKHAM, F. J. Central nervous system complications and management in sickle cell disease. **Blood**, v. 127, n. 21, p. 2647, 2016.
- DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid Storm in Infection and Inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 511–523, 2015.
- EBERT, E. C.; NAGAR, M.; HAGSPIEL, K. D. Gastrointestinal and Hepatic Complications of Sickle Cell Disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 8, n. 6, p. 483–489, 2010.
- ECKMAN, J. R. LEG ULCERS IN SICKLE CELL DISEASE. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 10, n. 6, p. 1333–1344, 1 dez. 1996.
- EMMANUELCHIDE, O.; CHARLE, O.; UCHENNA, O. Hematological parameters in association with outcomes in sickle cell anemia patients. **Indian Journal of Medical**

**Sciences**, v. 65, n. 9, p. 393–398, 2011.

FRENETTE, P. S. Sickle cell vaso-occlusion: Multistep and multicellular paradigm. **Current Opinion in Hematology**, v. 9, n. 2, p. 101–106, 2002.

GARGIULO, R. et al. Sickle cell nephropathy. **Disease-a-Month**, v. 60, n. 10, p. 494–499, 2014.

GRAIDO-GONZALEZ, E. et al. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. **Blood**, v. 92, n. 7, p. 2551–2555, 1998.

GUALANDRO, S. F. M.; FONSECA, G. H. H.; GUALANDRO, D. M. Complicações cardiopulmonares das doenças falciformes Cardiopulmonary complications of sickle cell disease. v. 29, n. 3, p. 291–298, 2007.

HARIRI, E. et al. Sickle cell nephropathy: an update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. **International Urology and Nephrology**, v. 50, n. 6, p. 1075–1083, 2018.

HASSELL, K. L. Population Estimates of Sickle Cell Disease in the U.S. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 38, n. 4, p. S512–S521, abr. 2010.

IBE, B. O. et al. Plasma and urinary leukotrienes in sickle cell disease: possible role in the inflammatory process. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 24, n. 1, p. 57–64, 1994.

IYER, S. et al. Hemoglobinopathy in India. **Clinica Chimica Acta**, v. 444, p. 229–233, 2015.

KALINSKI, P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E 2 . **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 1, p. 21–28, 2012.

KATO, G. J. Priapism in Sickle Cell Disease: A Hematologist's Perspective Gregory. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 9, n. 1, p. 70–78, 2012.

KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 1–22, 2018.

KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 750–760, 2017.

KAWAHARA, K. et al. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin e receptors. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 414–421, 2015.

LADIZINSKI, B. et al. Sickle cell disease and leg ulcers. **Advances in Skin and Wound Care**, v. 25, n. 9, p. 420–428, 2012.

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

MATSUOKA, T.; NARUMIYA, S. Prostaglandin receptor signaling in disease. **TheScientificWorldJournal**, v. 7, p. 1329–1347, 2007.

MCGANN, P. T.; WARE, R. E. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 14, n. 11, p. 1749–1758, 2 nov. 2015.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p.

428–435, 2008.

MEIER, E. R. Treatment Options for Sickle Cell Disease. **Pediatric Clinics of North America**, v. 65, n. 3, p. 427–443, jun. 2018.

MENAA, F. Stroke in sickle cell anemia patients: A need for multidisciplinary approaches. **Atherosclerosis**, v. 229, n. 2, p. 496–503, 2013.

MINNITI, C. P. et al. **Leg ulcers in sickle cell disease**. *American Journal of Hematology. Anais...* 23 jul. 2010

MINNITI, C. P. et al. Laboratory and echocardiography markers in sickle cell patients with leg ulcers. **American Journal of Hematology**, v. 86, n. 8, p. 705–708, 2011.

MINNITI, C. P.; KATO, G. J. Critical Reviews: How we treat sickle cell patients with leg ulcers. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 1, p. 22–30, 2016.

MOUCLIS, V. D.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 catalysis and lipid mediator lipidomics. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.**, v. 1864, n. 6, p. 766–771, 2019.

NAGEL, R. L. A Knockout of a Transgenic Mouse — Animal Models of Sickle Cell Anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 3, p. 194–195, 16 jul. 1998.

NGUYEN, J. et al. Phenotypic Characterization the Townes Sickle Mice. **Blood**, v. 124, n. 21, p. 4916–4916, 6 dez. 2014.

NOLAN, V. G. et al. Sickle cell leg ulcers: Associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF- $\beta$ /BMP pathway. **British Journal of Haematology**, v. 133, n. 5, p. 570–578, jun. 2006.

OKPALA, I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease - A red cell disorder. **Blood Reviews**, v. 18, n. 1, p. 65–73, 2004.

PALADINO, S. F. Úlceras De Membros Inferiores Na Anemia Falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 288–290, 2007.

PETERS-GOLDEN, M. et al. Leukotrienes: Underappreciated Mediators of Innate Immune Responses. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 2, p. 589–594, 2005.

PICCIN, A. et al. Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anaemia and possible treatment. **European Journal of Haematology**, v. 102, n. 4, p. 319–330, 2019.

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

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

PINTO, V. M. et al. Sickle cell disease: a review for the internist. **Internal and Emergency Medicine**, v. 14, n. 7, p. 1051–1064, 2019.

PLATT, O. S. et al. Mortality In Sickle Cell Disease -- Life Expectancy and Risk Factors for Early Death. **New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 23, p. 1639–1644, 9 jun. 1994.

RAPHAEL, I. et al. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p. 5–17, jul. 2015.

- REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018–2031, 2010.
- RUIZ, M. A. Anemia falciforme. Objetivos e resultados no tratamento de uma doença de saúde pública no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 203–204, 2007.
- SANT'ANA, P. G. DOS S. et al. Clinical and laboratory profile of patients with sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 1, p. 40–45, 2017.
- SANTOS, E. D. C. et al. Hemólise Extravascular Associada À Ocorrência E Recorrência De Úlcera De Perna Na Doença Falciforme. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 42, n. S 2, p. 45–46, 2020.
- SCHNOG, J. B. et al. Sickle cell disease; a general overview. **Netherlands Journal of Medicine**, v. 62, n. 10, p. 364–374, 2004.
- SEIXAS, M. O. et al. Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, p. 1–9, 2010.
- SETTY, B. N. Y.; STUART, M. J. Eicosanoids in sickle cell disease: Potential relevance of neutrophil leukotriene B4 to disease pathophysiology. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 139, n. 2, p. 80–89, 2002.
- SHORES, J. et al. Reduced cholesterol levels in African-American adults with sickle cell disease. **Journal of the National Medical Association**, v. 95, n. 9, p. 813–817, 2003.
- SILVA, W. S. et al. Screening for structural hemoglobin variants in bahia, Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 2, p. 13–18, 2016.
- SPECTOR, A. A.; KIM, H. Y. Cytochrome P450 epoxygenase pathway of polyunsaturated fatty acid metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 356–365, 2015.
- STEINBERG, M. H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: Overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **TheScientificWorldJournal**, v. 8, p. 1295–1324, 2008.
- SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 16, p. 11613–11617, 2007.
- SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease - Elsevier Medical Artwork. **Annual Review of Pathology**, n. October, p. 261–290, 2018.
- SZCZEPANEK, S. M. et al. Splenic morphological changes are accompanied by altered baseline immunity in a mouse model of sickle-cell disease. **American Journal of Pathology**, v. 181, n. 5, p. 1725–1734, 2012.
- TAKADA, M. et al. Augmentation of interleukin-10 in pancreatic islets after brain death. **Transplantation Proceedings**, v. 36, n. 5, p. 1534–1536, 2004.
- THEOCHARIDOU, E.; SUDDLE, A. R. The Liver in Sickle Cell Disease. **Clinics in Liver Disease**, v. 23, n. 2, p. 177–189, 2019.
- TISDALE, J. F.; THEIN, S. L.; EATON, W. A. Treating sickle cell anemia. **Science**, v. 367, n. 6483, p. 1198–1199, 2020.

TSUGE, K. et al. Molecular mechanisms underlying prostaglandin E2-exacerbated inflammation and immune diseases. **International Immunology**, v. 31, n. 9, p. 597–606, 2019.

YOKOMIZO, T.; NAKAMURA, M.; SHIMIZU, T. Leukotriene receptors as potential therapeutic targets. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 7, p. 2691–2701, 2018.

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

ZINDEL, J.; KUBES, P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 15, p. 493–518, 2020.

ZOCCAL, K. F. et al. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. **Nature Communications**, v. 7, 2016.

## ANEXOS

## Anexo A: Artigo publicado

**Título:** Inclusion Complexes of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs with Cyclodextrins: A systematic Review.

**Autores:** Gustavo Marinho Miranda, Vitória Ohana Ramos e Santos, Jonatas Reis Bessa, Yanna C. F. Teles, Setondji Cocou Modeste Alexandre Yahouédéhou, Marilda Souza Goncalves, Jaime Ribeiro-Filho.

**Revista:** Biomolecules, fator de impacto: 4.879

**DOI:** <https://doi.org/10.3390/biom11030361>

Data de publicação: 27/02/2021




---

*Review*

## Inclusion Complexes of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs with Cyclodextrins: A Systematic Review

Gustavo Marinho Miranda <sup>1</sup>, Vitória Ohana Ramos e Santos <sup>1</sup>, Jonatas Reis Bessa <sup>2</sup>, Yanna C. F. Teles <sup>3</sup>, Setondji Cocou Modeste Alexandre Yahouédéhou <sup>1</sup>, Marilda Souza Goncalves <sup>1</sup> and Jaime Ribeiro-Filho <sup>1,\*</sup>

 **check for updates**

**Citation:** Miranda, G.M.; Santos, V.O.R.; Bessa, J.R.; Teles, Y.C.F.; Yahouédéhou, S.C.M.A.; Goncalves, M.S.; Ribeiro-Filho, J. Inclusion Complexes of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs with Cyclodextrins: A Systematic Review. *Biomolecules* **2021**, *11*, 361. <https://doi.org/10.3390/biom11030361>

Received: 28 January 2021  
Accepted: 22 February 2021  
Published: 27 February 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<sup>1</sup> Laboratory of Investigation in Genetics and Translational Hematology, Gonçalo Moniz Institute (IGM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, BA 40296-710, Brazil; gustavobiomedi116@gmail.com (G.M.M.); victoria.ohana@outlook.com (V.O.R.e.S.); modya006@yahoo.fr (S.C.M.A.Y.); marilda.goncalves@fiocruz.br (M.S.G.)

<sup>2</sup> Institute of Psychology (IPS), Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, BA 40170-055, Brazil; jonatas.reisbessa@gmail.com

<sup>3</sup> Agrarian Sciences Center (CCA), Department of Chemistry and Physics (DQP), Federal University of Paraíba (UFPB), Arara, PB 58397-000, Brazil; yanna@cca.ufpb.br

\* Correspondence: jaime.ribeiro@fiocruz.br; Tel.: +55-71-3126-2226

**Abstract:** Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are one of the most widely used classes of medicines in the treatment of inflammation, fever, and pain. However, evidence has demonstrated that these drugs can induce significant toxicity. In the search for innovative strategies to overcome NSAID-related problems, the incorporation of drugs into cyclodextrins (CDs) has demonstrated promising results. This study aims to review the impact of cyclodextrin incorporation on the biopharmaceutical and pharmacological properties of non-steroidal anti-inflammatory drugs. A systematic search for papers published between 2010 and 2020 was carried out using the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) protocol and the following search terms: "Complexation"; AND "Cyclodextrin"; AND "non-steroidal anti-inflammatory drug". A total of 24 different NSAIDs, 12 types of CDs, and 60 distinct inclusion complexes were identified, with meloxicam and  $\beta$ -CD appearing in most studies. The results of the present review suggest that CDs are drug delivery systems capable of improving the pharmacological and biopharmaceutical properties of non-steroidal anti-inflammatory drugs.

**Keywords:** cyclodextrins; non-steroidal anti-inflammatory drugs; inclusion complexes

### 1. Introduction

Inflammation is the body's response to tissue damage, which aims to restore the integrity of the injured tissue through different mechanisms of induction, regulation, and resolution. Regardless of the aggressor stimulus, this response is essential for the restoration of homeostasis and, therefore, plays an important physiological role [1,2].

While inflammation is essential for the host defense against pathogens, it frequently occurs in the absence of infection, a phenomenon known as sterile inflammation [3,4]. Accordingly, despite the existence of efficient control mechanisms, failures in the resolution of inflammation often occur, which contributes significantly to the pathogenesis of several chronic diseases [5,6]. In these cases, the inflammatory response is the main cause of tissue injury and disease progression, besides contributing to the severity of other comorbidities [7,8].

The classical therapeutic strategies for inflammatory diseases are mostly based on the use of anti-inflammatory drugs that act by either inhibiting the production of pro-inflammatory mediators or preventing the recruitment and activation of leukocytes at the inflammatory site [9,10]. In this context, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are one of the most widely used drug classes in the treatment of inflammation, fever, and pain. The mechanism of action underlying the anti-inflammatory, antipyretic, and

**Anexo B:** Artigo publicado

**Título:** Avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e citoprotetora da quercetina contra a ação tóxica do cloreto de bário

**Autores:** Francisco Eduardo Tavares Mendes, Gustavo Marinho Miranda, Helena Kelly Vieira Sobreira Camilo, Rivânia da Silva Lira, Vanessa de Carvalho Nilo Bitu, Celestina Elba Sobral de Souza.

**Revista:** Research, Society and Development, fator de impacto: 1.78

**DOI:** <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15632>

Data de publicação: 22/05/2021

Research, Society and Development, v. 10, n. 6, e12610615632, 2021  
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15632>

**Avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e citoprotetora da quercetina contra a ação tóxica do cloreto de bário**

**Evaluation of the antimicrobial, antioxidant and cytoprotective activity of kercetin against the toxic action of barium chloride**

**Evaluación de la actividad antimicrobiana, antioxidante y citoprotectiva de la kercetina frente a la acción tóxica del cloruro de bario**

Recebido: 30/04/2021 | Revisado: 06/05/2021 | Aceito: 09/05/2021 | Publicado: 22/05/2021

**Francisco Eduardo Tavares Mendes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1021-338X>

Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, Brasil

E-mail: [tavareseduardo39@gmail.com](mailto:tavareseduardo39@gmail.com)

**Gustavo Marinho Miranda**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6013-054X>

Fundação Oswaldo Cruz, Brasil

E-mail: [gustavobiomed116@gmail.com](mailto:gustavobiomed116@gmail.com)

**Helena Kelly Vieira Sobreira Camilo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5057-5548>

Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, Brasil

E-mail: [helenakel1998@gmail.com](mailto:helenakel1998@gmail.com)

**Rivânia da Silva Lira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9818-0035>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, Brasil

E-mail: [rivania.lira@ifma.edu.br](mailto:rivania.lira@ifma.edu.br)

**Vanessa de Carvalho Nilo Bitu**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0688-1403>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: [vanessanilobitu@gmail.com](mailto:vanessanilobitu@gmail.com)

**Celestina Elba Sobral de Souza**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9595-5728>

Centro Universitário Vale do Salgado, Brasil

Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, Brasil

E-mail: [sobralelba5@gmail.com](mailto:sobralelba5@gmail.com)



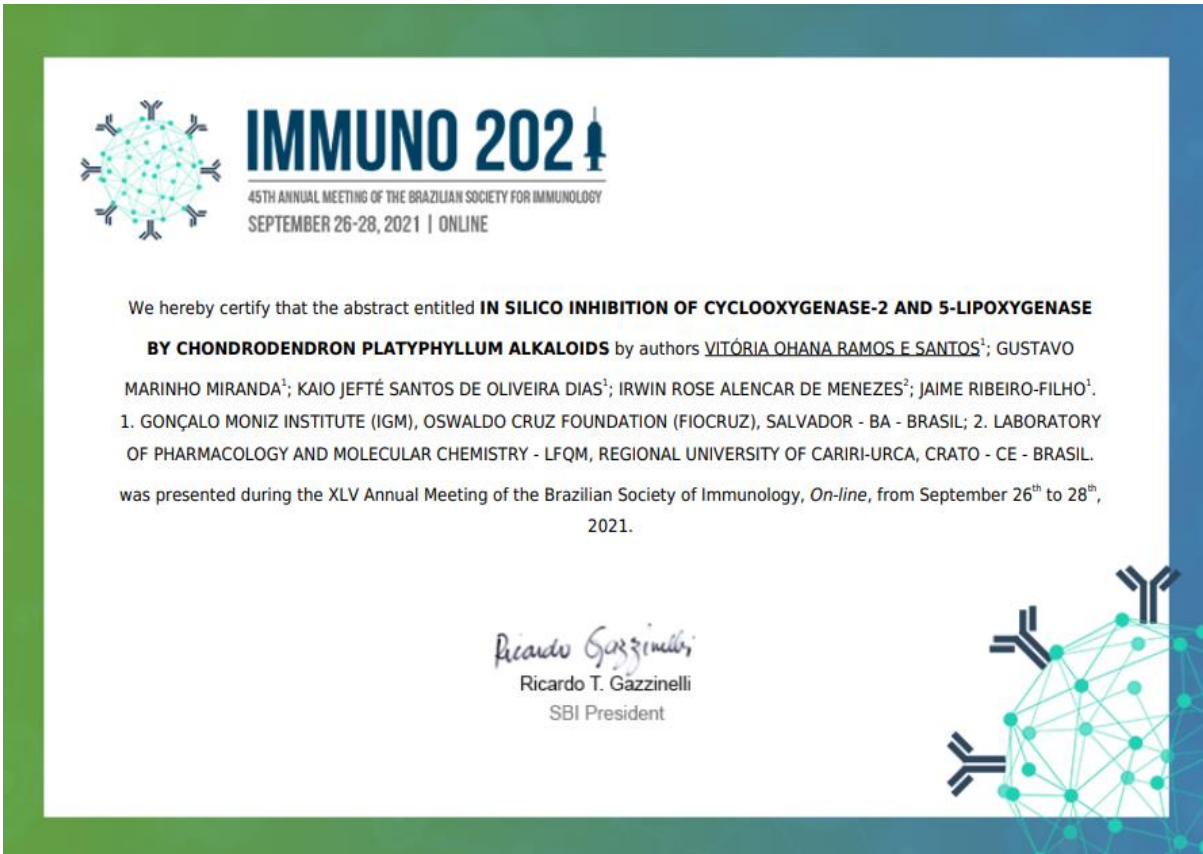
**Anexo C:** Apresentação de trabalho em evento científico


**Título do trabalho:** *In silico* inhibition of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase by *Chondrodendron platyphyllum* alkaloids

**Autores:** Vitória Ohana Ramos e Santos; Gustavo Marinho Miranda; Kaio Jefte Santos De Oliveira Dias; Irwin Rose Alencar De Menezes; Jaime Ribeiro-Filho.

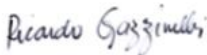
**Evento:** XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology


Data de apresentação: 26/09/2021



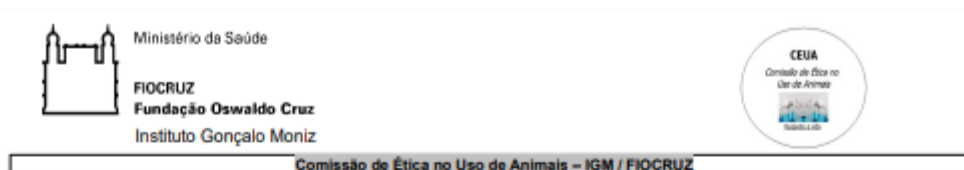
 **IMMUNO 2021**  
45TH ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR IMMUNOLOGY  
SEPTEMBER 26-28, 2021 | ONLINE

We hereby certify that the abstract entitled **IN SILICO INHIBITION OF CYCLOOXYGENASE-2 AND 5-LIPOXYGENASE BY CHONDRODENDRON PLATYPHYLLUM ALKALOIDS** by authors VITÓRIA OHANA RAMOS E SANTOS<sup>1</sup>; GUSTAVO MARINHO MIRANDA<sup>1</sup>; KAIO JEFTÉ SANTOS DE OLIVEIRA DIAS<sup>1</sup>; IRWIN ROSE ALENCAR DE MENEZES<sup>2</sup>; JAIME RIBEIRO-FILHO<sup>1</sup>.  
1. GONÇALO MONIZ INSTITUTE (IGM), OSWALDO CRUZ FOUNDATION (FIOCRUZ), SALVADOR - BA - BRASIL; 2. LABORATORY OF PHARMACOLOGY AND MOLECULAR CHEMISTRY - LFQM, REGIONAL UNIVERSITY OF CARIRI-URCA, CRATO - CE - BRASIL.  
was presented during the XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, *On-line*, from September 26<sup>th</sup> to 28<sup>th</sup>, 2021.

  
Ricardo T. Gazzinelli  
SBI President



## Anexo D: Certificado de aprovação do CEUA – Projeto 002/2020



### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**PROTOCOLO: 002/2020**

**PROJETO: "Investigação Pré-Clinica de Novos Candidatos a Fármacos no Tratamento de Doenças Inflamatórias"**

COORDENADOR: Jaime Ribeiro Filho

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Camundongo transgênico B6; 129 – Townes HbAA	126M + 14F = 140
Camundongo transgênico B6; 129 – Townes HbSS	126M + 14F = 140
Camundongo transgênico B6;129 – Townes HbAS	14M + 14F = 28

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotados pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IGM) de 20/08/2020 e tem validade até 20/08/2022.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the IGM-FIOCRUZ at 08/20/2020, being valid until 08/20/2022.

SOLICITAMOS O ENVIO DOS RELATÓRIOS PARCIAL E FINAL NOS PRAZOS ESTABELECIDOS ABAIXO:

Vigência: 20/08/2020 a 20/08/2022



Relatório Parcial: 20/08/2021

Relatório Final: 20/08/2022

Salvador, 20 de Agosto de 2020.

Natália Machado Tavares  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

**Anexo E: Certificado de aprovação do CEUA – Projeto 021/2019**

 Ministério da Saúde <b>FIOCRUZ</b> Fundação Oswaldo Cruz Instituto Gonçalo Moniz		<b>Comissão de Ética no Uso de Animais – IGM / FIOCRUZ</b>
--	---	--

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**PROTOCOLO: 021 /2019**

**PROJETO:** "Avaliação da terapia com h-PDGF recombinante e células-tronco mesenquimais no tratamento de úlceras cutâneas de camundongos falcêmicos"

**COORDENADOR:** Vitor Valério Maffili

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Camundongo transgênico B6;129 – Townes HbAA	70
Camundongo transgênico B6;129 – Townes HbSS	70
Camundongo transgênico B6;129 – Townes HbAS	90

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IGM) de 04/12/2019 e tem validade até 04/12/2021.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the IGM-FIOCRUZ at 12 /04/ 2019, being valid until 12/ 04 /2021.

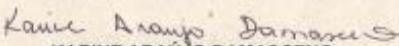
**SOLICITAMOS O ENVIO DOS RELATÓRIOS PARCIAL E FINAL NOS PRAZOS ESTABELECIDOS ABAIXO:**


**Vigência:** 04/12/2019 a 04/12/2021

**Relatório Parcial:** 04/12 /2020

**Relatório Final:** 04/12/2021

Salvador, 04 de Dezembro de 2019.

  
**KARINE ARAÚJO DAMASCENO**  
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Instituto Gonçalo Moniz - FIOCRUZ



---

CEP- Rua Waldemar Falcão, nº 121, Candeal, Salvador, Bahia, CEP 40.296-710, Brasil.  
 Tel: (55)-(71) 3176-2285 e-mail: ceua@bahia.fiocruz.br