

**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA**

**CURSO DE MEDICINA**

**ANA LUÍSA VAZ VALOIS**

#### ASSOCIAÇÃO ENTRE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E METABOLÔMICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

#### SALVADOR - BA

**2023**

**ANA LUÍSA VAZ VALOIS**

#### ASSOCIAÇÃO ENTRE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E METABOLÔMICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Curso de Graduação em Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para aprovação parcial no 4º ano do curso de Medicina.

**Orientadora: Doutora Ana Marice Teixeira Ladeia**

#### Salvador

**2023**

#### AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho. Primeiramente, quero agradecer a minha orientadora, Profa. Dra. Ana Marice Teixeira Ladeia, pela orientação, perseverança, paciência e valiosas ideias fornecidas ao longo deste processo. Seu apoio foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço igualmente aos doutores Paulo Roberto Ribeiro de Jesus e Amâncio José de Souza e às doutoras Cristiane Maria Carvalho Costa Dias e Rozana dos Santos Teixeira, que compartilharam seus conhecimentos e experiências, enriquecendo meu aprendizado.

Os mestrandos Juliana Guimarães Santos e Robson Santos Santana merecem um agradecimento especial por terem estado ao meu lado quando iniciei na pesquisa, me apresentando esse mundo da ciência na prática.

Também desejo estender meus agradecimentos aos meus amigos e familiares, que sempre me incentivaram e me apoiaram em todos os momentos, desde o início desta jornada acadêmica.

#### RESUMO

A anemia falciforme é uma doença genética que pode lesionar todos os sistemas do corpo e que afeta a vida de milhares de brasileiros, além de provocar grandes custos socioeconômicos. Entender seus mecanismos fisiopatológicos é importante para o desenvolvimento de novos tratamentos e métodos de avaliação do prognóstico. **Objetivo:** testar a hipótese de que existe associação entre disfunção endotelial e o perfil de metabolômica em crianças e adolescentes com anemia falciforme. **Metodologia:** estudo de corte transversal analítico com a utilização de técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear unidimensionais para avaliar a composição metabolômica de crianças e adolescentes com anemia falciforme e sem hemoglobinopatias (60 indivíduos, 20 com anemia falciforme e disfunção endotelial, 20 com anemia falciforme e sem disfunção endotelial e 20 sem hemoglobinopatias) que foram submetidos a avaliação clínica e laboratorial. **Resultados:** a amostra foi constituída por 22 crianças e adolescentes com HbSS e disfunção endotelial, 24 com HbSS e sem disfunção endotelial, e 35 escolares saudáveis, que pertenciam ao grupo controle. Foi demonstrado que o perfil metabolômico do grupo anemia falciforme com disfunção endotelial diverge muito dos demais e, que, portanto, os biomarcadores metabolômicos “Choline containing”, “Sphinganine”, ““(LysoPC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)”, “D-Lactic acid” e “Proline” são, possivelmente, influenciados pela disfunção endotelial. Além disso, é sugestivo que os biomarcadores laboratoriais hemoglobina, hematócrito e leucócitos sofrem alterações de acordo com o endotélio disfuncional. **Conclusão:** Estes resultados fornecem uma forte evidência de uma assinatura metabólica para os indivíduos com anemia falciforme e disfunção endotelial. Espera-se que com estes achados seja possível direcionar futuras pesquisas para elucidar as alterações bioquímicas na anemia falciforme.

Palavras-chave: Metabolômica. Anemia Falciforme. Disfunção Endotelial.

#### ABSTRACT

Sickle cell anemia is a genetic disease that can damage all body systems and affects the lives of thousands of Brazilians, also it causes significant socioeconomic costs. Understanding its physiopathology mechanisms is important for developing new treatments and prognostic evaluation methods. **Objective**: To test the hypothesis that there is an association between endothelial dysfunction and the metabolomic profile in children and teenagers with sickle cell anemia. **Methods:** An analytical cross-sectional study was conducted using one-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopic techniques to evaluate the metabolomic composition of children and teenagers with sickle cell anemia, both with and without hemoglobinopathies (60 individuals in total, 20 with sickle cell anemia and endothelial dysfunction, 20 with sickle cell anemia and without endothelial dysfunction and 20 without hemoglobinopathies). These individuals underwent clinical and laboratory analysis. **Results:** The sample comprised of 22 children and teenagers with HbSS and endothelial dysfunction, 24 with HbSS without endothelial dysfunction, and 35 healthy schoolchildren in the control group. It has been demonstrated that the metabolomic profile of the sickle cell anemia with endothelial dysfunction group differs significantly from the other groups. Therefore, the metabolomic biomarkers “Choline containing”, “Sphinganine”,

“(LysoPC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)”, “D-Lactic acid” and “Proline” are possibly influenced by endothelial dysfunction. **Conclusion:** These results provide strong evidence of a metabolic signature in individuals with sickle cell anemia and endothelial dysfunction. It is expected that these findings will make it possible to direct future research towards elucidating the biochemical changes in sickle cell anemia.

Keywords: Metabolomic. Sickle Cell Anemia. Endothelial Dysfunction.

 **SUMÁRIO**

[1 INTRODUÇÃO 4](#_Toc40655)

[2 OBJETIVOS 6](#_Toc40656)

[2.1 Geral 6](#_Toc40657)

[3 REVISÃO DA LITERATURA 7](#_Toc40658)

[4 METODOLOGIA 12](#_Toc40659)

[4.1 Desenho do estudo 12](#_Toc40660)

[4.2 Local e período do estudo 12](#_Toc40661)

[4.3 População 12](#_Toc40662)

[4.4 Critérios de inclusão 12](#_Toc40663)

[4.4.1 Grupo HbSS 12](#_Toc40664)

[4.4.2 Grupo sem HbSS 13](#_Toc40665)

[4.5 Critérios de exclusão 13](#_Toc40666)

[4.5.1 Grupo HbSS 13](#_Toc40667)

[4.5.2 Grupo sem HbSS 13](#_Toc40668)

[4.6 Cálculo do tamanho amostral 13](#_Toc40669)

[4.7 Variáveis de interesse 14](#_Toc40670)

[4.8 Protocolo de coleta de dados 14](#_Toc40671)

[4.9 Aspectos éticos 17](#_Toc40672)

[4.10 Análise Estatística 17](#_Toc40673)

[5 RESULTADOS 19](#_Toc40674)

[6 DISCUSSÃO 24](#_Toc40675)

[7 CONCLUSÃO 28](#_Toc40676)

[8 REFERÊNCIAS 29](#_Toc40677)

[9 ANEXOS 33](#_Toc40678)

# INTRODUÇÃO

A doença falciforme (DF) é uma hemoglobinopatia que afeta diversos sistemas do corpo, de forma que praticamente todos os órgãos podem ter algum nível de comprometimento. Nela, a mutação do gene da hemoglobina adulta normal (HbA) gera uma hemoglobina variante, a HbS. Assim, a manifestação da doença ocorre quando o gene mutado é herdado em homozigose, como na anemia falciforme, ou em heterozigose, contanto que também apresente o gene de uma outra hemoglobina variante, como a hemoglobina C (HbC) ou Betatalassemia (1).

No Brasil, cerca de 3.000 crianças nascem com DF anualmente e outras 200.000 nascem com o traço falciforme. Enquanto no cenário nacional, a incidência do traço falciforme é de 1:35 nos nascidos vivos (2), na Bahia, devido ao contexto histórico, a incidência é de 1:17 e com diagnóstico apenas de anemia falciforme é de 1:650, sendo este o estado brasileiro que ocupa o primeiro lugar nessa classificação (3).

A HbS torna a hemoglobina mais propensa a polimerização, o que gera um dano estrutural na membrana das hemácias e, então, ela adquire um formato de foice. Desse modo, essas células sofrem hemólise e geram o quadro de anemia hemolítica, acompanhado de episódios vaso-oclusivos recorrentes, gerando e potencializando a disfunção endotelial (DE) e uma resposta inflamatória crônica (2,4). A ativação do endotélio é de origem multifatorial, sendo fruto de situações como a menor síntese de óxido nítrico (NO), o aumento do estresse oxidativo (5) e a perfusão inadequada dos tecidos (4). Assim, a vasculatura do indivíduo com AF fica sujeita aos vasoconstritores endógenos e à adesão plaquetária (5), o que favorece novos episódios de vaso-oclusão e suas complicações tanto a curto quanto a longo prazo, criando um ciclo que se autoalimenta (4).

A análise metabolômica consiste na caracterização dos metabólitos presentes plasma, o que possibilita o melhor entendimento e monitorização das vias bioquímicas. Na população com AF, através dessa análise, é possível identificar desvios e diferenças que possam existir, podendo fazer comparações tanto entre grupos de pessoas com e sem AF quanto entre grupos apenas de pessoas com AF, criados com base em algum critério, como o uso ou não uso de hidroxiureia (6).

A hidroxiureia (HU) é o medicamento mais utilizado hoje na prevenção de crises vaso-oclusivas na AF (7). Isso, pois ela atuará direta e indiretamente nos diferentes fatores que estão envolvidos na disfunção do endotélio: na diminuição na formação de radicais livres de oxigênio e aumento da síntese de antioxidantes (7); na redução da polimerização da hemoglobina e consequente hemólise (7,8); no aumento da síntese de NO, elevando assim sua biodisponibilidade (6,9); Além dessas ações, seu principal mecanismo é o aumento na produção de hemoglobina fetal, uma hemoglobina capaz de transportar as moléculas de oxigênio de forma bem sucedida (10,11).

Portanto, sabe-se que muitas das manifestações clínicas presentes nessa doença tem como base um endotélio disfuncional, de forma que é possível que existam ainda mais vias metabólicas alteradas na população com AF e com DE.A análise metabolômica é uma técnica relativamente nova, que apesar de já ter sido explorada em diversas doenças, poucos foram os estudos que investigaram a metabolômica da AF, sobretudo em crianças e adolescentes e comparando grupos com e sem DE. Esclarecer quais rotas metabólicas estão desviadas nesses perfis de indivíduos portadores de AF pode possibilitar um melhor entendimento da doença e da estratégia terapêutica farmacológica mais utilizada, a hidroxiureia. Portanto, o sistema de saúde e a sociedade como um todo pode ser beneficiada, uma vez que amplia os conhecimentos sobre essa área, o que pode direcionar os profissionais de saúde para um caminho mais assertivo e de otimização de recursos.

# OBJETIVOS

## Geral

Testar hipótese de que existe associação entre disfunção endotelial e o perfil de

metabolômica em crianças e adolescentes com anemia falciforme.

# REVISÃO DA LITERATURA

##### Epidemiologia

As doenças falciformes (DF) são doenças monogênicas muito comuns no mundo. Elas sempre apresentaram grande prevalência nas regiões da África Subsaariana, Oriente Médio e Índia, mas, com o tráfico de escravizados e as migrações contemporâneas, a sua distribuição ao redor do planeta tornou-se menos concentrada nessas áreas e passou a também ser percebida em lugares como Brasil e Estados Unidos, que são os países fora da África e Ásia com os maiores números de nascidos com DF anualmente (1,12). Consequentemente, essa é uma doença mais prevalente nos afrodescendentes e na camada mais desfavorecida socioeconomicamente (13).

Apesar dos avanços que a medicina e a tecnologia proporcionaram para esses indivíduos, a doença ainda é muito marcada por episódios agudos, danos sistêmicos e progressivo aos órgãos (6), afetando a qualidade e a expectativa de vida, que é quase 30 anos menor em comparação com a população no geral (1), alcançando a faixa de 48 anos de idade no Brasil (3). Estima-se que anualmente 3.000 crianças nasçam com DF, em todo o país, sendo a Bahia, o estado brasileiro com a maior incidência de nascidos vivos diagnosticados com Anemia Falciforme (AF), com 1:650. A Bahia ocupa o primeiro lugar com uma incidência duas vezes maior que estado colocado em 2º lugar no ranking, o Rio de Janeiro, com 1:1300 (3). Dessa forma, por mais que a severidade e apresentação clínica seja variada, toda a população acometida precisa de assistência contínua, normalmente desde os primeiros anos de vida, o que aumenta os gastos para saúde pública (6).

##### Fisiopatologia

A AF é caracterizada pela mutação do gene Beta da globina, na qual o 17º nucleotídeo do cromossomo 11 é alterado de Timina para Adenina, fazendo com que o 6º aminoácido da cadeia seja a Valina em vez do Ácido Glutâmico, formando uma hemoglobina anormal, a HbS (12,14). Sendo assim, diferentes genótipos podem causar doença falciforme, sendo a anemia falciforme o tipo mais comum, que consiste na homozigose para o alelo da HbS (1,12).

Em situações de desoxigenação nos indivíduos com AF, devido à polimerização da hemoglobina S, as hemácias desidratam, alterando sua arquitetura e flexibilidade e adquirindo um formato de foice. O tempo de desoxigenação, a concentração intracelular de HbS e a presença de hemoglobina fetal na hemácia, que consequentemente reduz a concentração de HbS, são fatores que determinam o quanto a hemoglobina vai se polimerizar. Esse fenômeno é a base dos principais processos fisiopatológicos que levam às manifestações clínicas da AF (12).

A polimerização da HbS gera um estresse oxidativo que leva a ruptura das interações entre citoesqueleto e membrana das hemácias, promovendo uma fragilização celular progressiva com tendência à fragmentação. Assim, a hemólise, um dos principais processos fisiopatológicos da doença falciforme, faz com que a hemoglobina S e outras moléculas intracelulares sejam liberadas para o plasma sanguíneo (4,12). Dessa forma, ocorre a liberação de endotelina-1, potente vasoconstritor, assim como depleção do óxido nítrico (NO) e maior exposição de moléculas de adesão endotelial, ativando o endotélio e formando um microambiente pró-inflamatório. Isso faz com que diferentes tipos celulares, como leucócitos e plaquetas, migrem para esse ambiente e produzam citocinas e superóxidos, causando lesão endotelial e instalando de fato uma reação inflamatória que, ao longo do tempo, torna-se crônica (4,5).

##### Disfunção Endotelial

A ativação do endotélio vascular na anemia falciforme tem origem multifatorial. Inicialmente, vale salientar que as células do endotélio vascular são lesadas diretamente pela HbS livre proveniente das hemólises (4). Além disso, hemólise é um dos fatores que leva ao aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-1β, PCR e endotelina-1. Tais mediadores inflamatórios induzem a expressão de moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1, que interagem com as moléculas de adesão presentes na membrana das hemácias falcêmicas, reticulócitos, plaquetas e leucócitos (4). Assim, quando diferentes tipos celulares interagem entre si, forma-se um aglomerado de células que interrompe o fluxo sanguíneo e, consequentemente, prejudica a perfusão adequada dos tecidos, ativando o endotélio (4,12).

Além disso, a redução na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) é outro fator que influencia a magnitude da disfunção endotelial, uma vez que causa prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio (5). Vale lembrar que o NO é produzido pela enzima NO sintetase e que essa enzima é produzida em grande parte pelo endotélio (REFERÊNCIA). Ela utiliza a L-arginina como substrato e liga-se ao guanilil ciclase solúvel, convertendo GTP em GMPc, promovendo relaxamento do músculo liso vascular e vasodilatação (4). Nesse sentido, no processo de hemólise, há liberação da enzima arginase-1, que metaboliza a arginina em ornitina, poliaminas e prolinas, reduzindo a concentração de substrato para produção de NO e induzindo a proliferação de músculo liso, deposição de colágeno e estenose vascular (4,12,15). Além disso, a hemoglobina S livre no plasma, resultante da lise das hemácias, gera espécies reativas de oxigênio, que induzem estresse oxidativo e perturbam a homeostasia do NO (5).

Dessa forma, o NO, um importante fator na manutenção do tônus vascular ao antagonizar potentes vasoconstritores, como a angiotensina II e a endotelina1, e inibir a adesão plaquetária, apresenta-se em menores concentrações na anemia falciforme (5). Essa redução local de NO pode retardar o fluxo sanguíneo, favorecendo o processo de falcização dos eritrócitos e aumentando a ativação plaquetária e a expressão das moléculas de adesão nos leucócitos e células endoteliais, enquanto a depleção crônica de NO pode contribuir para vasculopatia e hipertensão pulmonar (4). Todas essas consequências da redução do NO promovem a disfunção endotelial. Em contrapartida, a disfunção do endotélio reduz a produção da enzima NO sintetase, gerando um processo cíclico que se retroalimenta. A partir disso, pode-se entender a saúde vascular como um reflexo da função endotelial (5).

##### Análise metabolômica

 A análise metabolômica permite a identificação de vias bioquímicas alteradas e, consequentemente biomarcadores que auxiliem na caracterização da doença e no desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas. Além disso, possibilita o melhor entendimento da farmacocinética e farmacodinâmica da hidroxiureia (HU) (6). Porém, é necessário salientar que as amostras de plasma não necessariamente refletem apenas os componentes genéticos, uma vez que podem ser modificadas por dieta, medicamentos em uso e comorbidades, dificultando a descoberta desses biomarcadores (6).

Estudos prévios já demonstraram que a análise metabolômica é capaz de diferenciar os fenótipos da AF, na medida em que demonstraram uma grande uniformidade fenotípica no grupo com AF em uso de HU (6). Nessa análise, o critério de diferenciação foi uso ou não de HU, sendo percebido que o grupo AF sem HU apresentava menores níveis de creatina/creatinina, um produto da quebra da arginina (6,16) Logo, entende-se que, possivelmente, os níveis de arginina são menores nas pessoas com AF em comparação com as pessoas com AF que usam a droga e as pessoas do grupo controle (6). Esse é um dos motivos que podem desencadear episódios de vaso-oclusão mais frequentes, visto que menores concentrações de arginina levam a menores concentrações de NO, prejudicando a vasodilatação dependente do endotélio. Além disso, sabe-se que outras vias metabólicas estão desviadas, como é o caso dos metabólitos derivados de glicerofosfolipídios e esfingolipídios, que diferem entre os indivíduos com e sem AF (6), ressaltando que alterações envolvendo fosfolipídeos também estão envolvidas na fisiopatologia e inflamação da AF (17).

Portanto, percebe-se que análise metabolômica pode ajudar na criação de perfis metabolômicos específicos de acordo com os critérios selecionados, o que seria muito útil na elucidação de estratégias terapêuticas e diagnósticas. Ademais, permite a monitorização de mudanças metabólicas associadas à doença, visto que é possível caracterizar os metabólitos plasmáticos de cada grupo que está sendo estudado.

##### Hidroxiureia

A escassez de tratamentos farmacológicos aprovados para a AF é um dos motivos que dificulta a realização de uma intervenção terapêutica muito assertiva e que todos ou pelo menos a grande maioria dos indivíduos possa aderir, trazendo fortes implicações negativas para a qualidade de vida da população com AF. A hidroxiureia é um dos poucos medicamentos utilizados na AF e seu principal uso é na prevenção de crises vaso-oclusivas (7).

Um dos principais mecanismos de ação da hidroxiureia se baseia no aumento da produção de hemoglobina fetal (10,11). Por outro lado, um estudo sugere que a HU tem a capacidade de atenuar o estresse oxidativo por meio da indução indireta da transcrição de genes antioxidantes e pelo sequestro direto de radicais livres (7). Esses mecanismos ainda reduziriam a polimerização da hemoglobina, diminuindo o dano tecidual e o nível de inflamação do organismo (7,8). Dessa forma, o grau de perturbação oxidativa diminui a níveis indistinguíveis aos dos pacientes que faziam parte do grupo controle, e consequentemente, há menor frequência de crises álgicas, síndrome torácica aguda e outros eventos agudos que possam levar a hospitalizações e necessidade de transfusão (7,18–20).

Por outro lado, sabe-se que a HU também age corrigindo parcialmente alguns desvios metabólitos, principalmente nas vias que envolvem a creatina/creatinina, leucina/isoleucina e LysoPC (22:4 (7Z, 10Z, 13Z, 16Z)) (6,9). Dessa forma, essa é uma droga que possivelmente contribui com o aumento do pool de arginina disponível para a síntese de NO, demonstrando um mecanismo secundário em que pode ser benéfica para pessoas com AF.

# METODOLOGIA

## Desenho do estudo

Estudo de corte transversal analítico com grupo de comparação com soroteca proveniente de estudo prévio intitulado “Avaliação das Alterações Cardiovasculares e Respiratórias em Crianças e Adolescentes com Anemia

Falciforme” de acordo com o protocolo descrito a seguir

## Local e período do estudo

Ambulatório de Hematologia do Ambulatório Magalhães Neto – Complexo Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) da Faculdade de Medicina da Bahia - UFBA e na Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA), centros de referência no atendimento e tratamento de doenças hematológicas. A coleta de dados foi realizada entre os anos de 2014 e 2015.

## População

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

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

## Critérios de inclusão

### Grupo HbSS

Faixa etária de 6 a 18 anos;

Hb SS diagnosticado por eletroforese de Hb e/ou cromatografia líquida de alta performance;

Ausência de eventos agudos há um mês;

Sem quadros infecciosos há um mês;

Assinatura do TCLE, indicando concordância em participar do estudo;

### Grupo sem HbSS

Faixa etária de 6 a 18 anos;

Aparentemente saudáveis, sem diagnósticos de patologias agudas;

Hb AA, obtida por eletroforese de Hb e/ou cromatografia líquida de alta performance;

Ausência de infecções no último mês;

Indicador IMC/idade abaixo do escore Z+2, segundo curva da OMS;

Ausência de doenças crônicas;

Assinatura do TCLE, indicando concordância em participar do estudo;

## Critérios de exclusão

### Grupo HbSS

Acidente vascular encefálico prévio

Transfusão sanguínea há menos de 3 meses

### Grupo sem HbSS

Quadros infecciosos agudos, durante o processo de realização de exames

Doenças crônicas

Dislipidemia

## Cálculo do tamanho amostral

O cálculo amostral foi realizado tendo como base a primeira etapa do estudo que teve como objetivo avaliar a função endotelial de crianças e adolescentes com AF e sua associação com comorbidades (5).

O tamanho da amostra foi calculado baseado no desvio padrão da média de dilatação da artéria braquial, obtido em trabalho publicado na literatura de 0,2, para detectar diferença de 0,25 (21), considerando alfa de 0,05 e poder de 90%. Total de 30 indivíduos, 15 com HbSS e 15 sem hemoglobinopatia. Considerando dificuldades técnicas com a faixa etária pediátrica definiu-se 60 indivíduos, 20 com disfunção endotelial, 20 sem disfunção endotelial e 20 sem hemoglobinopatias, o cálculo foi executado através do programa de estatística WinPepi®.

No grupo de crianças que foram testadas para disfunção endotelial, 35 de 49 do grupo controle e 46 de 55 do grupo anemia falciforme tiveram a metabolômica testada, devido à hemólise do sangue.

## Variáveis de interesse

**Variáveis sociodemográficas e clínicas:**

Sexo (masculino, feminino), idade (anos), classificação da cor em branco e não branco, índice de massa corpórea (Kg/m2), escore Z do IMC, pressão arterial sistólica e diastólica (mmHg), vasodilatação mediada por fluxo, uso ou não de hidroxiureia.

**Variáveis laboratoriais:**

Hematócrito (%), hemoglobina (g/dl), volume globular médio (fL), concentração de hemoglobina corpuscular média (pg), leucócitos (x10³/L), plaquetas (x103/L), reticulócitos (%), lactato desidrogenase (U/L), transaminases (TGO e TGP) (U/L), bilirrubinas totais (mg/dl), bilirrubina indireta (mg/dl), glicemia (mg/dl).

## Protocolo de coleta de dados

##### Exame físico geral

**IMC e Escore Z do IMC:** O índice de massa corporal (IMC) foi calculado pela fórmula de Quetelet: quociente do peso pelo quadrado da altura (kg/m²). Classificação, segundo referência da OMS (2007) (22), faixa etária de 6 a 19 anos. Magreza acentuada: Escore Z < -3; Magreza: Escore Z > -3 e < -2; Eutrófico: Escore Z > -2 e < +1; Sobrepeso: Escore Z > +1 e < +2.

**Medida da pressão arterial (PA):** foi realizada após 5 minutos de repouso, na posição sentada. Foram utilizados manguitos nos tamanhos 12 e 14 cm de largura e 36 e 53 cm de extensão, a depender do comprimento e circunferência do braço. A largura do manguito ocupou 40% do comprimento do braço, medida no ponto médio entre o cotovelo e o acrômio, e o comprimento, 80 a 100% desta medida. O manômetro utilizado foi de coluna de mercúrio. A medida da pressão arterial foi feita com a campânula do estetoscópio colocada 02 cm acima da fossa cubital direita, sobre o pulso braquial, identificado por palpação digital, com o membro apoiado à altura do coração. A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida quando do aparecimento dos sons cardíacos (fase I de Koroktoff) e a pressão arterial diastólica (PAD) quando do seu desaparecimento (fase V) (23); o valor final da PA representou a média de três medidas consecutivas, medidas com intervalos de 60 segundos.

##### Avaliação da função endotelial

Para avaliação da função endotelial, empregamos protocolo estabelecido segundo Diretrizes para a avaliação ultrassonográfica da artéria braquial. Os exames foram realizados no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular – EBMSP após agendamento prévio, em equipamento VIVID 3 General Eletric Company – Israel, com transdutor multifrequencial de 7 a 12MHz. A função vasomotora dependente do endotélio foi avaliada por dilatação mediada pelo fluxo com hiperemia reativa. Os exames foram realizados com os participantes em jejum de 4 horas, após repouso de 30 minutos, com temperatura da sala controlada para 20 a 25°C. Para evitar variações circadianas todos os exames foram realizados no período matutino. Os pacientes foram examinados em decúbito dorsal, com o braço esquerdo posicionado ergonomicamente; eletrocardiograma sincronizado; verificação da frequência cardíaca e pressão arterial antes, durante e após o exame. A braçadeira do esfigmomanômetro de coluna de mercúrio, exercendo a função de um torniquete pneumático envolvendo o braço direito acima da prega do cotovelo; a artéria braquial identificada em secção longitudinal e posteriormente identificados a luz, o centro e a interface lúmeníntima da parede anterior e posterior do vaso; a amostra de Doppler posicionada em ângulo de 60°; adequação de controles da escala de cinza, profundidade, filtro e escala do Doppler. O aumento do fluxo foi induzido pela insuflação do torniquete ao redor do braço até 250mmHg, por 4 minutos, com monitorização contínua da imagem da artéria seguida de desinsuflação do torniquete, levando à hiperemia reativa; monitorização dos primeiros cinco fluxos; monitorização dos primeiros cinco fluxos (mensuração da velocidade máxima Doppler) e do diâmetro da artéria, durante 120 segundos (para medida do diâmetro ao final de 60 segundos). Vale ressaltar que o exame foi muito bem tolerado pelos participantes, não havendo referência de qualquer desconforto que tenha necessitado da interrupção do teste. Os exames foram realizados por médico com treinamento específico para realização do exame e com comprovada experiência técnica (24).

##### Coleta de sangue

Realizado por técnico habilitado e com experiência comprovada, no ADABEBMSP. Cerca de 10 ml de sangue foram colhidos por punção venosa, de cada paciente, após jejum mínimo de 12 horas, em frascos secos para as dosagens bioquímicas e frasco com EDTA para realização de hemograma. Após centrifugação, o soro foi armazenado em freezer, a -80°C. Foram dosados: Colesterol total (CT), HDL-C, triglicérides (TG). As dosagens do CT, HDL-C e TG foram realizadas por métodos enzimáticos, em laboratório de referência. O LDLC foi calculado pela fórmula Friedwald: LDL-c =  (CT - HDL-c) - TG/5) , com TG <400mg/dl. PCR quantitativa de alta sensibilidade foi mensurada pelo método de turbidimetria. As citocinas IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A e TNFα foram dosadas a partir de amostras de plasma purificadas e armazenadas congeladas a -80 °C através dos ensaios Luminex em lotes (Bio-Rad, Hercules, CA).

##### Aquisição e análise dos dados de metabolômica

Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN): A aquisição de dados metabolômicos por RMN foram feitas no Instituto de Química (IQ)-UFBA.

Aquisição de espectros de extratos realizada em equipamento de RMN de 500 MHz para 1H, 125 MHz para 13C e 50 MHz para 15N. Inicialmente será utilizada RMN-1D e a RMN-2D em amostras com muitos picos sobrepostos. Amostras foram solubilizadas em solventes deuterados: acetona-d6, DMSO-d6 e clorofórmio-d1. Tetrametilsilano será o padrão interno. Foi usado grande acervo de padrões comerciais (mais de cem compostos-carboidratos, aminoácidos e ácidos orgânicos) para identificação e quantificação dos picos na RMN.

O processamento dos dados metabolômicos (correção da linha de base e alinhamento dos espectros) e as análises estatísticas que foram utilizadas nos experimentos estão descritas em publicações do grupo situado no Instituto de Química (25–27). Para o processamento dos dados metabolômicos foi utilizado os programas Mestre Nova e NMRProcFlow. As análises univariadas foram realizadas com o auxílio do excel e do software Statistica. As análises estatísticas multivariadas, como a Análise de Componentes Principais (PCA), foram realizadas através da plataforma de análise de dados metabolômicos MetaboAnalyst 3.0 (http://www.metaboanalyst.ca/). Elas foram utilizadas para comparar conjuntos de espectros e identificar grupos de similaridade ou diferença para que conclusões pudessem ser tiradas sobre a classificação das amostras.

## Aspectos éticos

Em cumprimento às normas da resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012), esta pesquisa foi aprovada pelos comitês de ética da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, parecer nº 568.913 /2014 e CAEE – 17663913.2.0000 5544. O acesso aos dados de registro foi autorizado pelas diretorias do HGRS do HEMOBA e da FMB – UFBA.

## Análise Estatística

###### Estatística Descritiva

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

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

**Análise Bivariada e Multivariada:**

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

Usando o software JMP 10.0, os valores médios geométricos (log10) para cada metabolito foram calculados para toda a população estudada. Em cada grupo o heat map foi construído usando a variação de valores médios geométricos calculados para cada metabólito candidato.

Os dados foram submetidos à análise multivariada, pelo método supervisionado, análise discriminativa do princípio dos mínimos quadrados (PLS-DA), para uma compreensão mais ampla das mudanças metabólicas.

# RESULTADOS

A amostra foi constituída por 22 crianças e adolescentes com HbSS e disfunção endotelial (DE), 24 com HbSS e sem DE, e 35 escolares saudáveis, que pertenciam ao grupo de comparação. As médias ± desvio padrão (DP) da idade em anos foram semelhantes: 12,8 ± 2,12 ± 3 e 11,5 ± 3 (p = 0,350), respectivamente. O sexo masculino correspondeu a 50% dos pacientes do grupo anemia falciforme (AF) com DE, em comparação a 62,5% do grupo AF sem DE e 34,3% do grupo controle (p = 0,099). **Tabela 1**

O grupo AF com DE apresentou média ± DP do Escore Z do IMC -1,04 ± 0,9 *versus* -0,76 ± 1 *versus* -0,13 ± 1,3 (p = 0,019) em comparação ao grupo AF sem DE e grupo controle, respectivamente, de modo que o grupo controle foi o que apresentou escore Z maior. Nesta mesma ordem, o grupo AF com DE apresentou a VMF (vasodilatação mediada por fluxo), variável utilizada para medir a DE, com valor mais baixo 6,4 ± 2,2% *vs* 15,4 ± 4,4% *vs* 16,5 ± 8,4% (p < 0,001).Ademais, o grupo AF com DE demonstrou média ± DP mais baixa para Hemoglobina 7,9 ± 0,8 g/dL *vs* 8,1 ± 0,9 g/dL *vs* 13,1 ± 1 g/dL (p < 0,001) e para o Hematócrito 23,4 ± 2,6% *vs* 24,1 ± 3,4% *vs* 39,2 ± 3% (p < 0,001). **Tabela 1**

Por outro lado, o grupo AF com DE apresentou média ± DP semelhante ao grupo AF sem DE, mas elevada em relação ao grupo controle para leucócitos 12 ± 3,1x109/L *vs* 11 ± 3,2x109/L *vs* 7,2 ± 1,5x109/L (p < 0,001); lactato desidrogenase 1215 ± 496 U/L *vs* 1159 ± 699 U/L *vs* 391 ± 32 U/L (p = 0,002); plaquetas 431 ± 147x109/L *vs* 478 ± 128 x109/L *vs* 281 ± 48x109/L (p < 0,001); reticulócitos 7 ± 4,7% *vs* 8,7 ± 5,5% *vs* 0,8 ± 0,2% (p = 0,002); TGO 47 ± 17U/L *vs* 55 ± 15U/L *vs* 23 ± 12U/L (p < 0,001); bilirrubinas totais 3,3 ± 1,7mg/dL *vs* 3,4 ± 2,3mg/dL *vs* 0,44 ± 0,26mg/dL (p < 0,001). Esses níveis demonstram a presença de um padrão nos valores dos biomarcadores acima nos grupos com AF, independente da DE, que difere do grupo controle. Por fim, 50% dos pacientes do grupo AF com DE, 33,3% do grupo AF sem DE e 0% do grupo controle usavam hidroxiureia (p < 0,001). **Tabela 1**

**Tabela 1.** Características sociodemográficas e clínicas dos grupos Anemia Falciforme com

Disfunção Endotelial, Anemia Falciforme sem Disfunção Endotelial e Grupo Controle Características Grupo AF com DE Grupo AF sem Grupo controle P valor

 n=22 DE n=24 n=35

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Idade (anos)  | 12,8 ± 2  | 12 ± 3  | 11,5 ± 3  | 0,350  |
| Sexo masculino (%/n)  | 50% (11)  | 62, 5% (15)  | 34,3 % (12)  | 0,099  |
| Não brancos (%/n)  | 100% (22)  | 87,5% (21)  | 85,7 % (30)  | 0,192  |
| IMC (kg/m²)  | 17,1 ± 2,3  | 16,4 ± 1,8  | 18,7 ± 3,9  | 0,015  |
| Escore Z do IMC  | -1,04 ± 0,9  | -0,76 ± 1  | -0,13 ± 1,3  | 0,019  |
| PAS (mmHg)  | 98 ± 12  | 101 ± 13  | 97 ± 9,9  | 0,402  |
| PAD (mmHg)  | 55 ± 7,9  | 59 ± 13  | 63 ± 10  | 0,054  |
| VMF (%)  | 6,4 ± 2,2  | 15,4 ± 4,4  | 16,5 ± 8,4  | < 0,001  |
| Hemoglobina (g/dl)  | 7,9 ± 0,8  | 8,1 ± 0,9  | 13,1 ± 1  | < 0,001  |
| Hematócrito (%)  | 23,4 ± 2,6  | 24,1 ± 3,4  | 39,2 ± 3  | < 0,001  |
| VGM (fL)  | 92 ± 8,6  | 91,9 ± 12,6  | 82,8 ± 6,5  | 0,007  |
| CHCM (pg)  | 33,5 ± 1,7  | 33,4 ± 6,3  | 33 ± 1,3  | 0,934  |
| Leucócitos (x109/L)  | 12 ± 3,1  | 11 ± 3,2  | 7,2 ± 1,5  | < 0,001  |
| Plaquetas (x109/L)  | 431 ± 147  | 478 ± 128  | 281 ± 48  | < 0,001  |
| Reticulócitos (%)  | 7 ± 4,7  | 8,7 ± 5,5  | 0,8 ± 0,2  | 0,002  |
| Lactato desidrogenase (U/L)  | 1215 ± 496  | 1159 ± 699  | 391 ± 32  | 0,002  |
| TGO (U/L)  | 47 ± 17  | 55 ± 25  | 23 ± 12  | < 0,001  |
| TGP (U/L)  | 23 ± 12  | 34 ± 22  | 16 ± 9  | 0,010  |
| Bilirrubinas totais (mg/dl)  | 3,3 ± 1,7  | 3,4 ± 2,3  | 0,44 ± 0,26  | < 0,001  |
| Bilirrubina indireta (mg/dl)  | 2,6 ± 1,7  | 2,8 ± 2,2  | 0,34 ± 0,18  | 0,002  |
| Glicemia (mg/dl)  | 82 ± 9  | 78 ± 10  | 89 ± 9  | 0,017  |
| Uso de hidroxiureia (%/n)  | 50% (11)  | 33,3% (8)  | 0% (0)  | <0,001  |

As variáveis quantitativas normais foram expressas por médias e desvios-padrão e as não normais por medianas e intervalos interquartis quando não normais. As variáveis categóricas foram representadas através de frequência simples e porcentagens. Teste Anova Unidirecional entre grupos. AF (anemia falciforme), DE (disfunção endotelial), PAS (pressão arterial sistólica), PAD (pressão arterial diastólica), VGM (volume celular médio), CHCM (concentração de hemoglobina celular média), TGO (aspartato aminotransferase), TGP (alanina aminotransferase), VMF (vasodilatação mediada por fluxo), IMC (índice de massa corpórea).

Na análise metabolômica foram identificados 54 metabólitos, sendo 27 lipídios, 11 ácidos carboxílicos, 7 aminoácidos, 2 monossacarídeos, 1 álcool, uma amina, uma pirimidina, uma cetona e uma amidina.

De acordo com Heatmap, podemos observar que existe um padrão metabolômico distinto entre o grupo de anemia falciforme com disfunção endotelial e os grupos anemia falciforme sem disfunção endotelial e controle. Dessa forma, os seguintes metabólitos estão depletados no primeiro grupo enquanto nos demais grupos se encontram mais concentrados e com níveis similares entre si: Gamma Linoleic Acid, 2-Hidroxybutyric Acid, LysoPC(18:1(9Z)/0:0), 5-Acetylamino-6-Formylamino-3-Methyluracil, pHydroxyphenylacetic Acid, L-Alanine, VLDL, TMANO, Glycine, D-Lactic Acid, Choline Containing, D-Glucose, Acetic Acid, Citric Acid, LysoPE(18:1(11Z)/0:0), DE, L-Phenylalanine, Formic Acid e 3-Hydroxybutyric acid. **Figura 1**

Além desses, existem metabólitos que estão elevados no grupo anemia falciforme com disfunção endotelial enquanto nos grupos anemia falciforme sem disfunção endotelial e controle estão em menores níveis e similares entre si:

LysoPC(20:3(5Z,8Z,11Z)/0:0), Sphinganine,

LysoPC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0), 2-Hydroxy-3-methylbutyric acid, L-Glyceric,

acid, LysoPC(20:2(11Z,14Z)/0:0), LysoPC(P-18:0/0:0), 1-

Stearoylglycerophosphoserine, L-Leucine, LysoPC(16:0/0:0) e TG(12:0/8:0/8:0). **Figura 1**

**Figura 1.** Heatmap



A análise multivariada dos dados foi realizada através do modelo de análise discriminativa do princípio dos mínimos quadrados (PLS-DA). Segundo o Scores Plot, o grupo controle apresenta uma distribuição mais ampla em comparação com a dos grupos com participantes com anemia falciforme, além de possuir um agrupamento distinto dos demais grupos, sugerindo que o perfil metabólico do grupo controle é diferente dos grupos de indivíduos portadores de anemia falciforme sem e com disfunção endotelial. Por outro lado, os grupos anemia falciforme com disfunção endotelial e anemia falciforme sem disfunção endotelial se agrupam de forma mais semelhante, até mesmo apresentando regiões que se sobrepõem, sugerindo uma tendência de perfil metabólico semelhante entre ambos. **Figura 2**

**Figura 2.** Scores Plot



Figura 2. Gráfico de Scores Plot modelo PLS-DA, usado para comparar amostras dos grupos AF e DE, AF sem DE e grupo controle.

# DISCUSSÃO

A análise do perfil sociodemográfico dos participantes, como idade, sexo e cor da pele, não indicou diferença estatística significante entre os grupos estudados (Tabela 1). Dessa forma, é pouco provável que essas variáveis possam ter influenciado significativamente na presença e na magnitude da disfunção endotelial.

As médias da hemoglobina e do hematócrito dos participantes dos grupos Anemia Falciforme (AF) com Disfunção Endotelial (DE) e AF sem DE mostraramse menores em comparação as do grupo controle, o que é decorrente do processo hemolítico. Isso é reiterado por diferentes estudos que trazem dados laboratoriais dessa população, como um trabalho publicado em 2020 que também revelou concentrações reduzidas de hematócrito (30,76%) e hemoglobina (10,86 g/dL) (28). A hemoglobina também pode apresentar-se em níveis menores devido ao processo de fagocitose eritrocitária experimentado pelas células falciformes. Os portadores de anemia falciforme ainda costumam cursar com leucocitose, provavelmente relacionada a infecções e trombos das crises vaso oclusivas (28), o que também foi evidenciado por este trabalho.

As concentrações encontradas desses biomarcadores, hemoglobina, hematócrito e leucócitos, estão sutilmente mais alteradas no grupo AF com DE em comparação ao grupo AF sem DE, considerando a média ± desvio padrão do grupo controle como a referência de normalidade. Isso ocorre, visto que o principal mecanismo que causa a depleção de hemoglobina e hematócrito e elevação dos leucócitos é o mesmo que causa a disfunção endotelial: a hemólise. A lise das hemácias provoca uma série de reações inflamatórias, depleção de óxido nítrico (NO), liberação de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez contribuem para a DE direta e indiretamente. Esse é um mecanismo que se retroalimenta, uma vez que a DE vai promover um ambiente propício para perpetuação de processos hemolíticos através do aumento da expressão de moléculas de adesão, ativação plaquetária e manutenção de níveis diminuídos de NO (4,5,12). Dessa forma, essas alterações laboratoriais têm o potencial de refletir o perfil mais grave dos pacientes com DE, uma vez que promovem episódios de crises vaso oclusivas, dispneia e fadiga. Assim, esses biomarcadores são os poucos que atualmente fornecem informações prognósticas para o manejo da doença (29).

Algumas vias metabólicas encontram-se alteradas na AF, e esse estado metabólico desregulado pode impedir uma vasodilatação apropriada ao estresse isquêmico (30), tal qual o realizado no teste da Vasodilatação Mediada por Fluxo (VMF). No nosso estudo, através do Heatmap (Figura 1), foi observado que o metabólito representado pelo nome “Choline Containing” se apresentou em níveis muito baixos (entre -1 e -0,5) no grupo AF com DE, em níveis intermediários (entre -0,5 e 0) no grupo AF sem DE e em níveis mais altos (acima de 1) no grupo controle. Esse metabólito é um precursor da acetilcolina, um vasodilatador dependente de endotélio, e é encontrado em fosfolipídios, como a fosfatidilcolina, um dos principais tipos de fosfolipídios que compõem as membranas celulares, assim como no seu intermediário fosfocolina (31). Também já foi encontrada associação consistente entre o dismetabolismo da fosfocolina e redução da VMF em indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 2, doença que também apresenta disfunção endotelial exacerbada (32,33), assim como associação indireta da acetilcolina, outro vasodilatador dependente do endotélio (30). Dessa forma, a fosfocolina e a acetilcolina parecem influenciar na vasodilatação mediante estresse isquêmico, o que pode estar relacionado à disfunção endotelial.

Outra via metabólica que apresenta potencial relação com a disfunção endotelial na AF é a via do metabolismo do piruvato, glicólise ou gliconeogênese. Ao analisar o Heatmap (figura 1) percebe-se uma depleção de ácido lático (DLatic acid), envolvido no processo de fermentação lática, no grupo AF com DE que não é encontrada no grupo controle nem no grupo AF sem DE. Além do ácido lático, também há distinção, nesse mesmo padrão, para as concentrações de ácido cítrico e ácido acético, metabólitos que também estão envolvidos em diferentes circunstâncias do metabolismo energético, como no ciclo de Krebs, na forma de citrato e Acetil-CoA, respectivamente.

Sabe-se que a alteração dos níveis de ácido lático indica que a capacidade regulatória do metabolismo energético pode estar deficiente na AF

(29). Ademais, essa mudança do metabolismo energético, na qual outros compostos, como o lactato, o ânion produzido a partir do ácido lático, passam a competir como substrato, varia de acordo com a progressão da doença, estando presente nos estágios mais avançados e graves e servindo como biomarcador de estado crítico das doenças, por exemplo cirrose hepática e insuficiência cardíaca (IC) (34,35). Um estudo recente revelou que a IC é uma doença que apresenta uma disfunção do endotélio microvascular coronariano e, assim como a AF, demonstra um perfil metabolômico com indícios de aumento na inflamação, estresse oxidativo e depleção de lactato (34).

O estudo “Blood plasma metabolomics of children and adolescents with sickle cell anaemia treated with hydroxycarbamide: a new tool for uncovering biochemical alterations” (6), realizado com a mesma amostra desse trabalho, evidenciou que os portadores de anemia falciforme, tanto em uso de hidroxiureia quanto os que não usavam, apresentavam um perfil metabolômico com elevação de Esfinganina (Sphinganine) e Lisofosfatidilcolina

(LysoPC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)). Nesse sentido, através do presente trabalho, foi possível perceber que os elevados níveis desses metabólitos se relacionam com a presença de disfunção endotelial, uma vez que só estão elevados no grupo AF com DE, enquanto no grupo AF sem DE e grupo controle apresentam concentrações mais baixas e similares.

Por outro lado, mesmo estudo citado anteriormente, ambos os grupos apresentavam altos níveis de Prolina (Proline), o que sugeriu a existência de um mecanismo metabólico anti-estresse em resposta ao estado inflamatório da AF (6). Na análise atual, os níveis desse metabólito estão aumentados apenas no grupo AF sem DE, o que levanta a hipótese que apenas esse grupo está sendo capaz de desencadear tal resposta anti-estresse efetiva, enquanto o grupo com DE apresenta níveis similares ao grupo controle, ou seja, frente a agressão vascular, não consegue elaborar uma resposta adequada ao dano que está sendo experienciado, o que pode sugerir uma incapacidade do endotélio disfuncional.

Os dados apresentados no estudo demonstram que a análise metabolômica é capaz de distinguir os fenótipos da anemia falciforme, uma vez que o Scores Plot conseguiu separar o grupo controle dos grupos com AF e diferenciar os grupos AF com DE e AF sem DE entre si (Figura 2). Assim, essa abordagem consegue mostrar que a presença de disfunção endotelial está associada a um perfil metabolômico distinto entre os portadores de anemia falciforme. Vale ressaltar que os dados obtidos são provenientes de crianças e adolescentes, demonstrando, de forma precoce, a presença dessas alterações.

Entretanto, o corte transversal do trabalho certamente é uma limitação, visto que não é possível estabelecer uma relação de causalidade entre as variáveis. Além disso, apesar da significância estatística de algumas variáveis, o pequeno número amostral incluído no estudo também pode ser um fator limitante. A despeito dessas limitações, os resultados deste estudo são relevantes e contribuem de forma importante no conhecimento sobre aspectos fisiopatogênicos metabolômicos da disfunção endotelial.

# CONCLUSÃO

Nesse estudo foi demonstrado que o perfil metabolômico do plasma sanguíneo do grupo com portadores de anemia falciforme com disfunção endotelial é distinto do grupo com participantes falcêmicos sem disfunção endotelial e do grupo controle. Ainda foi possível perceber que os biomarcadores laboratoriais hemoglobina, hematócrito e leucócitos e biomarcadores metabolômicos “Choline containing”, “Sphinganine” e

“(LysoPC(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)” apresentam resultados promissores como biomarcadores da disfunção endotelial. Somado a isso, depleção do metabólito

“D-Lactic acid” demonstrou relação com estágios mais avançados e severos da anemia falciforme, o que também parece estar associado com o grau de disfunção endotelial do indivíduo. Por fim, é possível pensar, através da influência que exerce na concentração do metabólito “Proline”, que a disfunção endotelial interfere na resposta anti-inflamatória do organismo.

Espera-se que esses achados ajudem a nortear futuros trabalhos, visto que há grande potencial na aplicabilidade da metabolômica dentro da área de saúde, sobretudo no que concerne ao entendimento das alterações nas vias metabólicas decorrentes da disfunção endotelial dentro da anemia falciforme. Assim, é possível buscar novos tratamentos mais eficientes e direcionados a aspectos específicos da fisiopatologia da doença.

# REFERÊNCIAS

1. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. N Engl J Med

[Internet]. 20 de abril de 2017 [citado 7 de agosto de 2022];376(16):1561–

73. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(12)61229-x

1. Nascimento MI, Przibilski ALF, Coelho CSG, Leite KF de A, Makenze M, Jesus SB. Mortality attributed to sickle cell disease in children and adolescents in Brazil, 2000–2019. Rev Saude Publica. 1o de julho de 2022;56.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde.

Departamento de Atenção Especializada. Série B. Textos Básicos de Saúde. Brasília; 2012 [citado 7 de agosto de 2022]. Doença falciforme: condutas básicas para tratamento. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca\_falciforme\_condutas \_basicas.pdf

1. Bandeira ICJ. Estudo dos marcadores de inflamação: associação com os haplótipos do cluster da β-globina na anemia falciforme. [Fortaleza]: Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina; 2013.
2. Teixeira RS, Terse-Ramos R, Ferreira TA, Machado VR, Perdiz MI, Lyra IM, et al. Associations between endothelial dysfunction and clinical and laboratory parameters in children and adolescents with sickle cell anemia. PLoS One. 1o de setembro de 2017;12(9).
3. Ribeiro PR, Teixeira R dos S, Souza AR, Pereira TCS, Boffo EF, Carosio MGA, et al. Blood plasma metabolomics of children and adolescents with sickle cell anaemia treated with hydroxycarbamide: a new tool for uncovering biochemical alterations. Br J Haematol. 1o de março de 2021;192(5):922–31.
4. Vinhaes CL, Teixeira RS, Monteiro-Júnior JAS, Tibúrcio R, CubillosAngulo JM, Arriaga MB, et al. Hydroxyurea treatment is associated with reduced degree of oxidative perturbation in children and adolescents with sickle cell anemia. Sci Rep. 1o de dezembro de 2020;10(1).
5. Nader E, Grau M, Fort R, Collins B, Cannas G, Gauthier A, et al. Hydroxyurea therapy modulates sickle cell anemia red blood cell physiology: Impact on RBC deformability, oxidative stress, nitrite levels and nitric oxide synthase signalling pathway. Nitric Oxide. 1o de dezembro de 2018;81:28–35.
6. Lou TF, Singh M, Mackie A, Li W, Pace BS. Hydroxyurea generates nitric oxide in human erythroid cells: mechanisms for gamma-globin gene activation. Exp Biol Med (Maywood) [Internet]. novembro de 2009 [citado 23 de maio de 2023];234(11):1374–82. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19657070/
7. Nevitt SJ, Jones AP, Howard J. Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease. Cochrane Database Syst Rev [Internet]. 20 de abril de 2017 [citado 23 de maio de 2023];4(4). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28426137/
8. Ware RE. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. Blood [Internet]. 1o de julho de 2010 [citado 23 de maio de 2023];115(26):5300–11. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20223921/
9. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. Lancet [Internet]. 2010 [citado 28 de setembro de 2022];376(9757):2018–31. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21131035/
10. Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. Rev Bras Hematol Hemoter [Internet]. setembro de 2007 [citado 23 de maio de 2023];29(3):204–6. Disponível em: https://www.scielo.br/j/rbhh/a/NHyThBfzrf3ZSQDwD5M8Zmp/
11. Hostyn S V., De Carvalho WB, Johnston C, Braga JAP. Evaluation of functional capacity for exercise in children and adolescents with sickle-cell disease through the six-minute walk test. J Pediatr (Rio J) [Internet]. novembro de 2013 [citado 8 de maio de 2022];89(6):588–94. Disponível em: www.jped.com.br
12. Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. Rev Bras Hematol Hemoter [Internet]. setembro de 2007 [citado 9 de maio de 2023];29(3):204–6. Disponível em: http://www.scielo.br/j/rbhh/a/NHyThBfzrf3ZSQDwD5M8Zmp/
13. Keshet R, Erez A. Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. Dis Model Mech [Internet]. 1o de agosto de 2018 [citado 23 de maio de 2023];11(8). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30082427/
14. Wu H, Bogdanov M, Zhang Y, Sun K, Zhao S, Song A, et al. Hypoxiamediated impaired erythrocyte Lands’ Cycle is pathogenic for sickle cell disease. Sci Rep [Internet]. 20 de julho de 2016 [citado 23 de maio de

2023];6. Disponível em: /pmc/articles/PMC4951653/

1. Engel ER, Howard AL, Ankus EJ, Rico JF. Advances in Sickle Cell Disease Management. Adv Pediatr [Internet]. 1o de agosto de 2020 [citado 23 de maio de 2023];67:57–71. Disponível em: http://www.advancesinpediatrics.com/article/S0065310120300013/fulltext
2. Wang WC, Ware RE, Miller ST, Iyer R V., Casella JF, Minniti CP, et al. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: A multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). The Lancet [Internet]. 14 de maio de 2011 [citado 23 de maio de 2023];377(9778):1663–72. Disponível em: http://www.thelancet.com/article/S0140673611603553/fulltext
3. Amuel S, Harache C, Errin ILT, Oore IDM, Eorge G, Over JD, et al. Effect of Hydroxyurea on the Frequency of Painful Crises in Sickle Cell Anemia. https://doi.org/101056/NEJM199505183322001 [Internet]. 18 de maio de 1995 [citado 23 de maio de 2023];332(20):1317–22. Disponível em:

https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199505183322001

1. De Montalembert M, Aggoun Y, Niakate A, Szezepanski I, Bonnet D. Endothelial-dependent vasodilation is impaired in children with sickle cell disease. Haematologica [Internet]. dezembro de 2007 [citado 8 de maio de 2023];92(12):1709–10. Disponível em:

https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18055999/

1. Madigan C, Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part I: sickle cell disease. Expert Rev Mol Med [Internet]. 28 de abril de 2006 [citado 8 de maio de 2023];8(9):1–23. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16690007/
2. Barroso WKS, Rodrigues CIS, Bortolotto LA, Mota-Gomes MA, Brandão AA, Feitosa AD de M, et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. Arq Bras Cardiol [Internet]. 3 de março de 2021 [citado 8 de maio de 2023];116(3):516–658. Disponível em:

https://abccardiol.org/article/diretrizes-brasileiras-de-hipertensao-arterial2020/

1. Sampaio RR, Ladeia A, Meneses R, Lima M, Guimaraes A. C-Reactive Protein Is Not Correlated With Endothelial Dysfunction in Overweight and Obese Women. J Clin Med Res. 2013;
2. Ribeiro PR, Willems LAJ, Mudde E, Fernandez LG, de Castro RD, Ligterink W, et al. Metabolite profiling of the oilseed crop Ricinus communis during early seed imbibition reveals a specific metabolic signature in response to temperature. Ind Crops Prod. 1o de maio de 2015;67:305–9.
3. Ribeiro PR. Biochemical, physiological and molecular responses of Ricinus communis seeds and seedlings to different temperatures: a multiomics approach [Internet]. [Wageningen, The Netherlands]; 2015 [citado 8 de outubro de 2023]. Disponível em: https://research.wur.nl/en/publications/biochemical-physiological-andmolecular-responses-of-ricinus-comm
4. Ribeiro PR, Zanotti RF, Deflers C, Fernandez LG, de Castro RD, Ligterink W, et al. Effect of temperature on biomass allocation in seedlings of two contrasting genotypes of the oilseed crop Ricinus communis. J Plant Physiol. 1o de agosto de 2015;185:31–9.
5. Pereira T da CS. ANÁLISE METABOLÔMICA DO PLASMA DE INDIVÍDUOS COM OSTEONECROSE SECUNDÁRIA À DOENÇA FALCIFORME. 2020.
6. Alenzi FQ, Alshaya DS. Biochemical and Molecular analysis of the betaglobin gene on Saudi sickle cell anemia. 2019 [citado 24 de setembro de

2023]; Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.03.003

1. Beckman JA, Hu JR, Huang S, Farber-Eger E, Wells QS, Wang TJ, et al. Metabolomics reveals the impact of Type 2 diabetes on local muscle and vascular responses to ischemic stress. Clin Sci. 1o de setembro de 2020;134(17):2369–79.
2. Hasegawa Y, Hyoda S, Sawada H, Baba M. Preparation of high-purity organic carboxylic acid choline salts and choline. Kokai Tokkyo Koho [Internet]. 1999; Disponível em: http://classyfire.wishartlab.com/tax\_nodes/C0004150
3. Baldassarre MPA, Pipino C, Pandolfi A, Consoli A, Di Pietro N, Formoso G. Old and New Biomarkers Associated with Endothelial Dysfunction in Chronic Hyperglycemia. Vol. 2021, Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Hindawi Limited; 2021.
4. Kaur R, Kaur M, Singh J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: Molecular insights and therapeutic strategies. Vol. 17, Cardiovascular Diabetology. BioMed Central Ltd.; 2018.
5. Hage C, Löfgren L, Michopoulos F, nilsson R, Davidsson P, Kumar C, et al. Metabolomic Profile in HFpEF vs HFrEF Patients. J Card Fail. 1o de dezembro de 2020;26(12):1050–9.
6. Mcphail MJW, Shawcross DL, Lewis MR, Coltart I, Want EJ, Antoniades CG, et al. Multivariate metabotyping of plasma predicts survival in

 patients with decompensated cirrhosis.

# ANEXOS

##### Parecer substanciado ao CEP

