UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS

Campus de CAMPO GRANDE

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM - SBBq

LUIS ANTONIO DE SOUZA JUNIOR

O PAPEL DA VIA NRF2-ARE NA ADAPTAÇÃO REDOX CELULAR DURANTE CRISES VASO-OCLUSIVAS EM PESSOAS COM ANEMIA FALCIFORME

CAMPO GRANDE – MS
JUNHO – 2025

LUIS ANTONIO DE SOUZA JUNIOR

O PAPEL DA VIA NRF2-ARE NA ADAPTAÇÃO REDOX CELULAR DURANTE CRISES VASO-OCLUSIVAS DE PESSOAS COM ANEMIA FALCIFORME

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Édis Belini Junior.

Coorientador: Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva.

CAMPO GRANDE – MS

JUNHO – 2025

TERMO DE APROVAÇÃO

LUIS ANTONIO DE SOUZA JUNIOR

O PAPEL DA VIA NRF2-ARE NA ADAPTAÇÃO REDOX CELULAR DURANTE CRISES VASO-OCLUSIVAS EM PESSOAS COM ANEMIA FALCIFORME

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

30 de junho de 2025

_____

Prof.ª Dr. Lucas Gazarini

Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

_____

Prof.ª Drª. Larissa Paola Rodrigues Venancio

Universidade Federal do Oeste da Bahia

_____

Prof. Dr. Édis Belini Junior

Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

À minha mãe, Aldeneide, e ao meu pai, Luis, que caminharam sob o sol para que eu pudesse estudar na sombra, como uma homenagem ao amor, ao sacrifício e à dedicação de vocês.

Às minhas irmãs, Ana Cláudia e Maria Luiza, à minha sobrinha Alice Cavalcante e ao pequeno Ravi Cavalcante, que chegará neste mesmo ano em que concluo este trabalho, minha gratidão pelo apoio constante e pela presença incondicional, especialmente nos momentos mais desafiadores.

Às minhas grandiosas amigas: Amanda Berti, minha confidente de graduação e de vida; Gabriela Alves, minha companheira de edital e lutas; Victoria Simões, um verdadeiro pilar na construção de conhecimentos para minha formação; Bárbara Braga, minha amiga de boas risadas; Ingrid Dias, com quem compartilho momentos de aprendizado e crescimento; e Vanessa Ramos, que me ensinou a amar ainda mais a bioquímica, além do encanto que já existia. A vocês, pela amizade, apoio e incentivo, meus mais sinceros agradecimentos por tornarem esta jornada mais leve e especial.

E aos amigos que a Universidade e a vida me presentearam – Kézia Paula, Fabiana Araripe, Arthur Ramos, Felipe Teclo, Ana Albertin, Flaviene Torres e Danilo Donizete – pela parceria, pelas palavras de motivação e por estarem ao meu lado nos momentos bons e nos difíceis.

A todos, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor infinito e pela força que sustentou minhas mãos e minha mente ao longo desta caminhada, sou eternamente grato.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Édis Belini Junior, agradeço a infinita paciência, imensa sabedoria e incondicional apoio, que foram essenciais para cada passo desta trajetória.

Ao meu Coorientador, Prof. Dr. Danilo Silva, minha eterna gratidão pela dedicação, generosidade e orientação em todos os desafios.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Estadual de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNDECT), pelo apoio financeiro que tornou este trabalho possível, e aos pacientes do Hemocentro do Maranhão (HEMOMAR), pela doação das amostras e pela contribuição essencial para o estudo.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM/UFMS) e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM-UFMS), obrigado pela estrutura, suporte técnico e aprendizado que foram fundamentais para a realização desta pesquisa. A todos, minha eterna gratidão por tornarem este trabalho possível.

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma doença que apresenta ampla heterogeneidade clínica. Estudos voltados à identificação de moduladores genéticos e bioquímicos têm contribuído para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da doença. Entre esses mecanismos, o estresse oxidativo crônico, decorrente da insuficiência dos sistemas de defesa antioxidante, desempenha um papel central nos danos celulares observados. Nesse contexto, a via NRF2-ARE exerce papel fundamental na regulação da expressão de genes antioxidantes essenciais à manutenção do equilíbrio redox no ambiente eritrocitário. Diante disso. Este estudo teve como objetivo investigar a contribuição da via NRF2-ARE na adaptação redox de pacientes com AF em diferentes condições de crises de dor no último ano antecedente à coleta da amostra, sendo os pacientes sem crises de dor (SC, n=14), baixa frequência (BFC, n=7; 1 a 2 crises) e alta frequência (AFC, n=4; mais que seis crises). Foram realizadas análises hematológicas, avaliação da expressão relativa (qPCR) dos genes *NFE2L2, SOD1, CAT, GPX1, TXNRD1 e GSR* e das atividades enzimáticas da Cat, Gpx, Gr, GST e G6PDH por espectrofotometria. Os dados foram submetidos a testes de normalidade, análises univariadas (ANOVA ou Kruskal-Wallis), correlações (Pearson ou Spearman) e análise multivariada (PLS-DA). A caracterização hematológica não revelou diferenças estatísticas significativas entre os grupos, embora o grupo AFC tenha apresentado padrão de redução de hemoglobina e hematócrito. A análise PLS-DA demonstrou sobreposição considerável das variáveis hematológicas, de expressão gênica e atividade enzimática entre os grupos avaliados. Dentre os genes estudados, apenas *SOD1* apresentou menor expressão nos grupos com maior frequência de crises (p<0,005), contrariando a hipótese do estudo, na qual esperava-se maior expressão dos genes antioxidantes conforme o aumento da frequência de crises. Os demais genes não diferiram entre os grupos, sugerindo manutenção do nível residual de expressão em reticulócitos circulantes. A atividade enzimática da Cat foi maior no grupo AFC em relação ao BFC (p=0,003), o que pode refletir um mecanismo de adaptação redox em resposta à maior carga oxidativa associada às crises recorrentes, embora, possivelmente, ainda insuficiente para restabelecer a homeostase redox. As demais enzimas não apresentaram diferenças significativas, embora GPx e Gr tenham revelado padrões sugestivos de possível saturação/exaustão do ciclo GSH em contexto de estresse oxidativo elevado. Correlações significativas positivas foram observadas entre *NFE2L2* e os genes *SOD1 (ρ=0,680; p<0,001), TXNRD1 (r=0,507; p=0,010), GPX1 (r=0,591; p=0,002) e GRS (r=0,722; p<0,001)*, reforçando a influência do NRF2 na expressão de genes antioxidantes. No entanto, as correlações entre expressão gênica e atividade enzimática foram, em sua maioria, fracas ou ausentes. Em reticulócitos de pacientes com AF, a via NRF2-ARE parece mantida em nível constitutivo, sem escalonamento em função da frequência de crises, sugerindo limitação na resposta adaptativa antioxidante nessa população celular

Palavras-Chave: Estresse Oxidativo; Catalase; Superóxido Dismutase-1.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a disease that presents wide clinical heterogeneity. Studies aimed at identifying genetic and biochemical modulators have contributed to the understanding of the pathophysiological mechanisms of the disease. Among these mechanisms, chronic oxidative stress, resulting from the failure of antioxidant defense systems, plays a central role in the cellular damage observed. In this context, the NRF2-ARE pathway plays a fundamental role in regulating the expression of antioxidant genes essential for maintaining redox balance in the erythrocytic environment. Given this, the objective of this study was to investigate the contribution of the NRF2-ARE pathway in the redox adaptation of patients with AF under different conditions of pain crises in the last year before the start of the research, with patients without pain crises (SC, n=14), low frequency (BFC, n=7; 1 to 2 crises), and high frequency (AFC, n=4; more than six crises). Hematological analyses were performed, as well as an evaluation of the relative expression (qPCR) of the NFE2L2, SOD1, CAT, GPX1, TXNRD1, and GSR genes and the enzymatic activities of Cat, Gpx, Gr, GST, and G6PDH by spectrophotometry. The data were submitted to normality tests, univariate analyses (ANOVA or Kruskal-Wallis), correlations (Pearson or Spearman), and multivariate analysis (PLS-DA). Hematological characterization did not reveal statistically significant differences between the groups, although the AFC group showed a pattern of reduced hemoglobin and hematocrit. PLS-DA analysis demonstrated considerable overlap of hematological variables, gene expression, and enzyme activity between the groups evaluated. Among the genes studied, only SOD1 showed lower expression in the groups with higher seizure frequency ($p<0.005$), contrary to the study hypothesis, which expected higher expression of antioxidant genes as seizure frequency increased. The other genes did not differ between groups, suggesting maintenance of the residual level of expression in circulating reticulocytes. Cat enzyme activity was higher in the AFC group than in the BFC group ($p=0.003$), which may reflect a redox adaptation mechanism in response to the higher oxidative load associated with recurrent crises, although possibly still insufficient to restore redox homeostasis. The other enzymes did not show significant differences, although GPx and Gr revealed patterns suggestive of possible saturation/exhaustion of the GSH cycle in the context of high oxidative stress. Significant positive correlations were observed between NFE2L2 and the genes SOD1 ($ρ=0.680$; $p<0.001$), TXNRD1 ($r=0.507$; $p=0.010$), GPX1 ($r=0.591$; $p=0.002$), and GRS ($r=0.722$; $p<0.001$), reinforcing the influence of NRF2 on the expression of antioxidant genes. However, correlations between gene expression and enzyme activity were mostly weak or absent. In reticulocytes from patients with AF, the NRF2-ARE pathway appears to be maintained at a constitutive level, without scaling according to the frequency of crises, suggesting a limitation in the adaptive antioxidant response in this cell population.

Keywords: Oxidative Stress; Catalase; Superoxide Dismutase-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Base Molecular da Anemia Falciforme.....**22**

Figura 2. Fisiopatologia da anemia falciforme.....**24**

Figura 3. Regulação redox em hemácias.....**32**

Figura 4. Via Keap1-NRF2-ARE.....**34**

Figura 5. Expressão relativa de genes antioxidantes envolvidos na adaptação redox em reticulócitos.....**46**

Figura 6. Atividade de enzimas antioxidantes envolvidas na adaptação redox.....**47**

Figura 7. Gráfico de pontuação da PLS-DA dos dois primeiros componentes principais.....**48**

Figura 8. Correlações entre os níveis de expressão gênica de *NFE2L2* e enzimas antioxidantes.....**50**

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Comprovante de envio do projeto ao CEP.....65

.

.

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Questionário clínico de pesquisa.....**66**

Apêndice 2. Termo de consentimento livre e esclarecido.....**69**

Apêndice 3. Protocolo de separação de reticulócitos.....**72**

Apêndice 4. Avaliação de integridade de rRNA.....**75**

Apêndice 5. Boxplots de variáveis demográficas, genéticas e hematológicas na caracterização dos grupos de estudo.....**76**

Apêndice 6. Análises de correlação.....**78**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA – Dimetilarginina assimétrica

AF – Anemia Falciforme

ALT – Alanina Aminotransferase

ANOVA – Análise de Variância

ARE – *Antioxidant Response Element*

AST – Aspartato Aminotransferase

AVE – Acidente Vascular Encefálico

BSA – Albumina Bovina Sérica

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CAT – Catalase

CDDO-Me – Éster metílico do ácido 2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9-dien-28-óico

CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CNC bZIP – *Cap 'n' Collar basic leucine zipper*

Cul3 – *Cullin-3*

CVO – Crise Vaso-oclusiva

DMF – Dimetil fumarato

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

eDAMPS – Padrões moleculares associados a danos

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

G6P – Glicose-6-fosfato

G6PDH – Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

GPX1 – Glutationa Peroxidase 1

GR – Glutationa Redutase

GRS – Glutationa Redutase Gene

GSH – Glutationa Reduzida

GSSG – Glutationa dissulfeto

GST – Glutationa S-transferase

Hb – Hemoglobina

HBB – gene da beta-globina

HbF – Hemoglobina Fetal

HbS – Hemoglobina S

HEMOMAR – Hemocentro do Maranhão

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance

HU – Hidroxiureia

ICAM-1 – molécula de adesão intercelular 1

JASP – *Jeffrey's Amazing Statistics Program*

Keap1 – Proteína 1 associada à ECH tipo Kelch

LGBM – Laboratório de Genética e Biologia Molecular

MetHb – Metemoglobina

mRNA – RNA mensageiro

mU/mg de proteína – Miliunidades por miligrama de proteína

NETs – Armadilhas extracelulares de neutrófilos

NO – Óxido nítrico

NO2 – Dióxido de nitrogênio

NO_3^- – Nitrato

NRF2 – Fator Nuclear Fator 2 Relacionado ao Eritroide 2

$ONOO^-$ – Peroxinitrito

Oxi-Hb – Oxi-hemoglobina

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PLS-DA – *Partial Least Squares Discriminant Analysis*

PMBqBM – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular

PNTN – Programa Nacional de Triagem Neonatal

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

R^2 – Coeficiente de Determinação

RNA – Ácido Ribonucleico

RNAm. – RNA mensageiro

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

rRNA. – RNA ribossômico

SD – Desvio Padrão (*Standard Deviation*)

sMAF – Família Fibrossarcoma Músculo-aponeurótico Pequeno

SOD1 – Superóxido dismutase 1

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

STA – Síndrome Toráxica Aguda

tBOOH – Hidroperóxido de terc-butila

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TrxR – Tioredoxina redutase

TXNRD1 – Tiorredoxina Redutase 1

UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

VCAM-1 – *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*

VO – Vaso-oclusão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... **18**

2. REVISÃO DE LITERATURA.....**21**

2.1. Base molecular da anemia falciforme.....21

2.2. Frequência da anemia falciforme.....22

2.3. Fisiopatologia da Anemia Falciforme.....23

2.3.1. Processo de polimerização da hemoglobina S.....25

2.3.2. Vaso-oclusão.....25

2.3.3. Disfunção Endotelial.....26

2.3.4. Inflamação Estéril.....27

2.4. Eventos clínicos associados a vaso oclusão na anemia falciforme.....28

2.5. Estresse Oxidativo.....29

2.6. Regulação Redox Eritrocitária na Anemia Falciforme.....30

2.7. Via NRF2 e o Estresse Oxidativo.....33

3. OBJETIVOS **37**

3.1. Objetivo geral.....37

3.2. Objetivos específicos. 37

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....**38**

4.1. Casuística. 38

4.2. Considerações éticas. 40

4.3. Métodos. 40

4.3.1. Diagnóstico da anemia falciforme e caracterização dos grupos de estudo.....40

4.3.2. Cromatografia líquida de alta performance..... 40

4.3.3. Extração de DNA..... 40

4.3.4. Análise molecular para HbS por PCR-RFLP. 41

4.3.5. Análise molecular para alfa talassemia (-α 3.7Kb) por GAP-PCR.....41

4.4. Expressão gênica do NRF2 e genes antioxidantes.....42

4.4.1 Separação de reticulócitos, obtenção e avaliação da concentração e pureza do RNA 42

4.4.2. Síntese de DNA complementar (cDNA) 42

4.4.3. Análise de expressão gênica do Nrf2 e genes envolvidos na resposta antioxidante 42
4.5. Análise de atividade enzimática.....43

4.5.1. Avaliação de atividade enzimática da catalase.....43

4.5.2. Avaliação de atividade enzimática da glutationa peroxidase.....43

4.5.3. Avaliação de atividade enzimática da glutationa redutase. 43

4.5.4. Avaliação de atividade enzimática da glutationa S transferase.....43

4.5.5. Avaliação de atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase.....43

4.6. Quantificação da concentração proteica pelo método de Bradford.....44
5. Análises de dados. 45

6. RESULTADOS.....**46**

6.1. Análise de Expressão Gênica dos Genes Antioxidantes e do *NFE2L2*.....46

6.2. Análise de atividade enzimática.....47

6.3. Análise de correlações.....49

7. DISCUSSÃO.....**51**

8. CONCLUSÃO.....**57**

REFERÊNCIAS **58**

ANEXOS.....**65**

Anexo 1. Comprovante de envio do projeto ao CEP da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e CAAE.....65

APÊNDICES.....**66**

Apêndice 1. Questionário de pesquisa para a obtenção de dados clínicos dos pacientes participantes da pesquisa. 66

Apêndice 2. Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).....69

Apêndice 3. Protocolo de separação de reticulócitos.....72

Apêndice 4. Gel de agarose para avaliação de integridade de RNA.....75

Apêndice 5. Boxplots de variáveis demográficas, genéticas e hematológicas na caracterização dos grupos de estudo.....76

Apêndice 6. Análises de correlação.....78

1. INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é causada por uma mutação em homozigose no gene da beta-globina (*HBB*), localizado no cromossomo 11, que codifica uma das subunidades da hemoglobina (Hb), as cadeias betas. Essa mutação consiste em uma substituição pontual no vigésimo nucleotídeo do gene, onde uma adenina é substituída por uma timina. Essa alteração resulta na troca do aminoácido ácido glutâmico, que é hidrofílico, por uma valina, de caráter hidrofóbico. Essa mudança nas propriedades da Hb leva, em condições de hipóxia, à polimerização da hemoglobina S (HbS)(Kato *et al*., 2018; Sundd; Gladwin; Novelli, 2019).

A polimerização desencadeia uma cascata de eventos moleculares complexos, incluindo hemólise intra-extravascular, disfunção endotelial, processos inflamatórios e episódios de vaso-oclusão. Esses mecanismos estão diretamente associados aos processos fisiopatológicos característico da doença, que pode variar desde manifestações clínicas leves até condições graves, como síndrome torácica aguda (STA), crises vaso-oclusivas (CVO), acidente vascular encefálico (AVE), hipertensão pulmonar, priapismo e necrose óssea avascular (Williams; Thein, 2018).

No entanto, apesar da relevância da mutação da HbS para o desenvolvimento da anemia falciforme, essa alteração genética isolada não é suficiente para explicar a ampla heterogeneidade fenotípica observada entre os indivíduos acometidos. Evidências indicam que essa variabilidade clínica resulta da contribuição adicional de fatores genéticos moduladores — como os níveis de hemoglobina fetal (HbF), a co-herança de alfa-talassemia e diferentes haplótipos do gene β-globina —, além de influências ambientais que afetam de maneira significativa a expressão e a gravidade da doença (Freire *et al*., 2024; Silva; Faustino, 2023).

A complexidade clínica da anemia falciforme não se limita apenas às alterações estruturais da Hb, mas envolve também um ambiente celular cronicamente afetado por desequilíbrios redox. Nesse sentido, o estresse oxidativo surge como um dos pilares centrais da fisiopatologia da doença, sendo amplamente implicado na progressão de danos celulares e teciduais. Os eventos de auto-oxidação da HbS contribuem para a intensificação da formação de pró-oxidantes, impulsionados pelos

ciclos recorrentes de polimerização/despolimerização, pela liberação do grupo heme e pela redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). Esses mecanismos, associados à hemólise, favorecem a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ERO), agravando o estresse oxidativo intracelular. Diante desse cenário, torna-se essencial a atuação de sistemas antioxidantes robustos, capazes de mitigar os danos oxidativos e preservar a integridade celular (Kuhn *et al*., 2017; Silva *et al.,* 2013).

Na AF, os fatores de transcrição diretamente envolvidos na resposta ao estresse oxidativo, assim como os genes relacionados à resposta antioxidante, são pouco explorados. Além disso, estudos que investiguem a associação entre marcadores genéticos e oxidativos inter-relacionados, sob diferentes condições fisiopatológicas permanecem escassos. Novas evidências demonstram que o NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) desempenha um importante papel na adaptação redox celular em doenças com características de estresse crônico, como a AF (Keleku-Lukwete *et al*; 2015; Li *et al*; 2023; Sato *et al*; 2022).

O NRF2 é um fator de transcrição pertencente à família CNC bZIP (*Cap 'n' Collar basic leucine zipper*), cuja principal função é coordenar a expressão de genes antioxidantes. Em condições fisiológicas, sua atividade é controlada por proteínas repressoras que promovem sua degradação contínua. Contudo, diante do acúmulo de espécies reativas, como ocorre durante uma CVO, essas proteínas inibitórias se dissociam, permitindo o acúmulo citoplasmático do NRF2. Em seguida, o fator transloca-se para o núcleo, onde forma heterodímero com cofatores transcricionais e se liga aos elementos de resposta antioxidante (ARE*, Antioxidant Response Element*). A ligação do NRF2 com o ARE desencadeia a transcrição de aproximadamente 23 genes que desempenham papéis fundamentais na defesa celular contra danos oxidativos. Entre os genes alvo estão aqueles responsáveis pela síntese de superóxido dismutase 1 (*SOD1*), catalase (*CAT*), glutationa peroxidase 1 (*GPX1*), glutationa redutase (*GR*) e Tioredoxina redutase (*TXNRD1*) (He; Ru; Wen, 2020; Vomund *et al*., 2017).

Estudos têm demonstrado a relevância da via NRF2 como uma estratégia terapêutica promissora na AF, uma vez que sua ativação reforça a síntese de enzimas

antioxidantes e atenua os efeitos deletérios do estresse oxidativo. A revisão conduzida por Starlard-Davenport *et al*; (2025) abordou avanços recentes no desenvolvimento de terapias voltadas à modulação dessa via, com foco para compostos que atuam como ativadores do NRF2. Destaca-se o dimetil fumarato (DMF) como agonista do NRF2 ao inibir sua repressão citoplasmática mediada por KEAP1; a simvastatina com ativação da via NRF2 por meio da sinalização PI3K/AKT; o salubrinal como inibidor seletivo da desfosforilação de eIF2α, resultando no aumento da tradução de γ-globina e NRF2; a curcumina com ação antioxidante na via NRF2, e o sulforafano que potencializa a translocação nuclear do NRF2 e estimula a expressão de genes antioxidantes.

Especificamente na AF, o tratamento com CDDO-Me (éster metílico do ácido 2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9-dien-28-óico) resultou em efeitos benéficos em um modelo animal de camundongos com AF, promovendo a estabilização e o aumento dos níveis de Hb. O CDDO-Me induziu a translocação nuclear do NRF2 e aumentou a expressão de enzimas citoprotetoras e metabolizadoras de heme, como heme oxigenase-1 (HO-1) e NAD(P)H:quinona oxidoredutase 1 (NQO1), essenciais para a regulação do estresse oxidativo (Ihunnah *et al*. 2022). No estudo de Zhu *et al*. (2019), verificou-se que a ausência funcional de NRF2 em um modelo murino transgênico levou a um aumento significativo do estresse oxidativo, com elevação dos níveis de ERO e citocinas pró-inflamatórias. Esses achados reforçam o papel fundamental do NRF2 na manutenção da homeostase redox na AF, atuando como um regulador central na mitigação dos danos oxidativos.

Sabendo que o estresse oxidativo é um dos principais fatores agravantes na fisiopatologia da AF, compreender o fator de transcrição NRF2 e o papel dos genes antioxidantes é de grande relevância, pois fornece informações cruciais sobre a variabilidade transcricional. Além disso, essa compreensão contribui no esclarecimento da relação entre os genes oxidantes e a resposta ao estresse oxidativo durante os eventos de crise vaso oclusiva.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Base molecular da anemia falciforme

A doença falciforme (DF) é o termo utilizado para descrever um conjunto de síndromes causadas pela presença da hemoglobina S (HbS). Sua origem genética pode decorrer da homozigose para a mutação *HBB*:*c*.20A>T (HbSS), conhecida como AF, ou da heterozigose composta, em que a HbS está associada a mutações que originam outras variantes estruturais da cadeia β da globina, como a hemoglobina C (HbSC), ou a alterações que reduzem a produção de cadeias beta, como nas formas associadas à β-talassemia (Williams; Thein, 2018).

A AF é a hemoglobinopatia monogênica mais prevalente entre as doenças hematológicas no mundo e é reconhecida como a forma de maior significado clínico dentro da DF (Kato *et al*., 2018; Williams; Thein, 2018). A HbS resulta de uma mutação pontual no gene da β-globina (HBB), localizado no cromossomo 11p15.5. Essa mutação corresponde a um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), identificado como *rs334*, no qual há a substituição da base adenina (A) por timina (T) no sexto códon do gene, promovendo a troca da trinca GAG (ácido glutâmico, hidrofílico) por GTG (valina, hidrofóbica). Como consequência, forma-se um tetrâmero anormal de hemoglobina, a HbS ($\alpha_2\beta^S_2$), cuja estrutura altera a conformação dos eritrócitos e está na base das manifestações clínicas da AF. A Figura 1 ilustra a mutação e seus desfechos moleculares (Kato *et al*., 2018).

A variabilidade genotípica da DF está fortemente associada à heterogeneidade clínica observada entre os pacientes, influenciando diretamente a gravidade dos sintomas e o risco de complicações. Indivíduos homozigotos para a HbS (genótipo que ocasiona o perfil Hb SS) tendem a apresentar um quadro clínico mais severo, com maior frequência de CVO e hemólise exacerbada. Em contrapartida, aqueles com o genótipo que ocasiona o perfil HbSC, heterozigotos compostos para as hemoglobinas S e C, geralmente manifestam formas clínicas mais brandas da doença, embora ainda estejam suscetíveis a complicações como retinopatia proliferativa e eventos tromboembólicos. Além da mutação, diversos fatores genéticos modificadores também contribuem para essa diversidade fenotípica, incluindo os níveis de HbF, a coerança de alfa-talassemia, e polimorfismos em genes reguladores como *BCL11A*,

HBS1L-MYB e *MYB*. Esses elementos influenciam não apenas a intensidade do estresse oxidativo e da inflamação, mas também a frequência de eventos agudos e a resposta ao tratamento (Ghunney *et al.*, 2023; Kirkham *et al*., 2023).

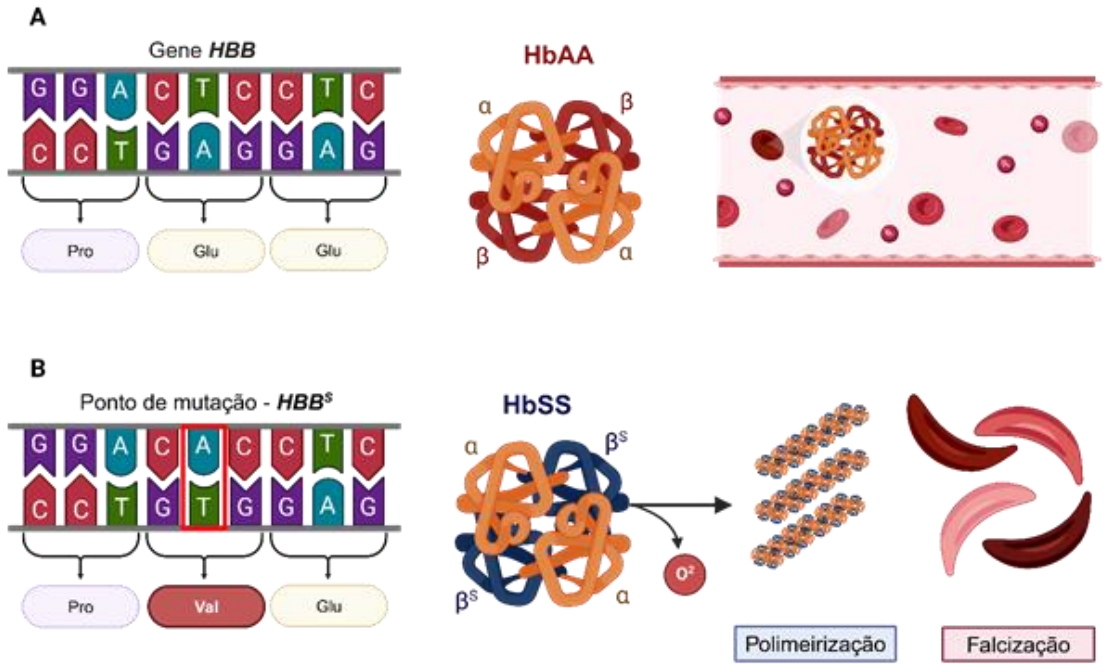


Figura 1. Base molecular da anemia falciforme. A hemoglobina normal (HbA) é composta por duas subunidades de α-globina e duas de β-globina ($\alpha^2\beta^2$). Na anemia falciforme, uma mutação pontual no gene da beta globina (*HBB*), presente no cromossomo 11*p*15.5, gera a troca de adenina por timina, resultando na troca do aminoácido glutamina por valina, alterando a estrutura proteica final. O resultado dessa mutação é a hemoglobina S (HbS), composta por duas α-globinas e duas β^S-globinas ($\alpha_2\beta^s{}_2$). Em condições de desoxigenação, a valina hidrofóbica presente na HbS promove a polimerização das moléculas, causando o enrijecimento e falcização dos eritrócitos. Modificada de Ramadas; Sparkenbaugh, 2023.

2.2. Frequência da Anemia Falciforme

Segundo Thomson *et al*., (2023), o Estudo Global sobre a Carga de Doenças, Lesões e Fatores de Risco, conduzido entre os anos de 2000 e 2021, demonstrou um aumento de 13,7% no número de recém-nascidos (RN) com AF, passando de aproximadamente 453.000 para 515.000 RN, com uma taxa global estimada de 382 casos por 100.000 nascidos vivos. Já no contexto da DF, que inclui diferentes genótipos, os dados de 2021 indicam que 76,5% dos RN com DF eram dos genótipos SS e Sβº, 19,6% do genótipo SC e 3,9% do genótipo $S\beta^+$. As regiões com maior número absoluto de nascimentos com DF, quando comparadas ao ano de 2000, foram a América Latina e o Caribe, impulsionadas principalmente pelo Brasil e República

Dominicana. Em contrapartida, observaram-se reduções mais expressivas na Europa Central, Ásia Central, Norte da África e Oriente Médio. Nesse cenário, os países com maior carga de nascimentos com DF em 2021 foram majoritariamente da África Subsaariana — incluindo Guiné Equatorial, Benin, Burkina Faso, Nigéria, Serra Leoa e Togo —, concentrando 79% da carga global. A Índia respondeu por outros 16% dos nascimentos globais com DF. Além disso, a prevalência global estimada de AF (casos totais na população) aumentou 41,4% no período, passando de 5,46 milhões em 2000 para 7,74 milhões em 2021. Esse aumento foi atribuído principalmente ao crescimento populacional (+31,1%) e à maior sobrevida dos pacientes (+29,3%), ainda que parcialmente compensado pelo envelhecimento populacional (-18,4%).

O Ministério da Saúde do Brasil estima que entre 60.000 a 100.000 indivíduos vivem com DF no país. De acordo com dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), entre 2015 e 2019, a incidência de DF foi de 45,92 casos por 100.000 nascidos vivos, com média de 82,5% de cobertura nacional de RN triados. Apesar da existência desses dados, a subestimação do número real de pessoas com DF ainda é um desafio significativo. A média de idade de mortes de pessoas com DF no país é de 32 anos, enquanto na população geral é de 69 anos, representando uma diferença de 37 anos. Além disso, 78,6% das pessoas com DF são pardas ou pretas, e 52,2% são mulheres. As regiões com maiores taxas de mortalidade por DF são o Sudeste, com 44,9% dos óbitos, e o Nordeste com 34,6% (Cançado *et al*., 2023).

2.3. Fisiopatologia da Anemia Falciforme

A fisiopatologia pode ser dividida em quatro eventos principais: (I) Polimerização da HbS; (II) Processo de vaso oclusão; (III) Disfunção endotelial e (IV) Inflamação estéril. Vale ressaltar que estes eventos *in vivo* ocorrem simultaneamente, em uma via que se retroalimenta. A divisão aqui proposta é de teor didático.

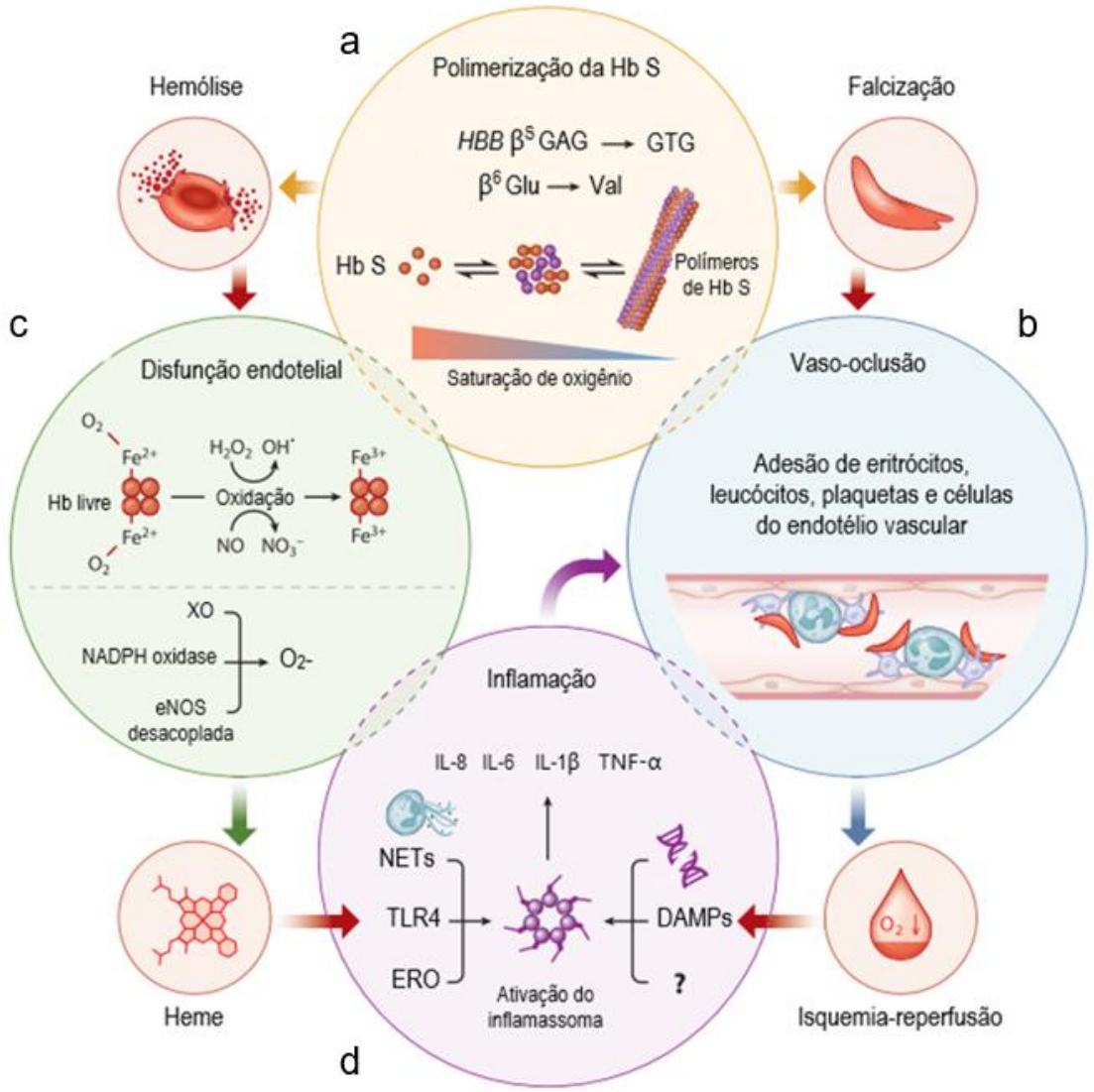


Figura 2. Fisiopatologia molecular da anemia falciforme. (a) A mutação *HBB*:c.20A>T no gene *HBB* ocasiona a substituição de um ácido glutâmico por uma valina na sexta posição da cadeia β globina, resultando na formação da Hb S. **(b)** Os rígidos polímeros de Hb S formados levam à falcização do eritrócito, com consequente formação de agregados de eritrócitos falcêmicos, leucócitos, plaquetas e células endoteliais, obstruindo o fluxo sanguíneo. Esse evento é referido como vaso-oclusão (VOC), o qual promove a lesão por isquemia-reperfusão. **(c)** Os polímeros de Hb S também ocasionam a hemólise, a qual libera Hb na circulação sanguínea. **(d)** A Hb livre promove disfunção endotelial por depletar o NO, formando EROs, e liberar o grupo heme, o qual juntamente com outras DAMPs ativam o inflamassoma. EROs são também produzidas pelas enzimas NADPH oxidase, XO e eNOS desacoplada. Por fim, o inflamassoma ativado por ERO, TLR4 e NETs, leva à produção de interleucinas e citocinas pró-inflamatórias. Os eventos são retroalimentados e constituem a complexa fisiopatologia da AF. DAMPs – padrões moleculares associados a dano; eNOS – óxido nítrico sintase endotelial; ERO – espécie reativa de oxigênio; Glu – ácido glutâmico; Hb – hemoglobina; *HBB* – gene da beta globina; IL – interleucina; NETs – armadilhas extracelulares de neutrófilos; NO – óxido nítrico; TLR4 – receptores tipo toll 4; TNF – fator de necrose tumoral; Val – valina; XO – xantina oxidase. Fonte: Adaptado de Sundd; Gladwin; Novelli, 2019.

2.3.1. Polimerização da hemoglobina S

O evento central da fisiopatologia da DF é a polimerização da HbS. Em condições de hipóxia, a desoxigenação intraeritrocitária, em tecidos com alta demanda de oxigênio, expõe os resíduos hidrofóbicos das cadeias de HbS (Figura 2a). Como consequência, as cadeias de HbS buscam estabilidade ao se ligarem a outros tetrâmeros de HbS desoxigenados, ocultando essas regiões hidrofóbicas. Esse processo leva à nucleação de polímeros de HbS, formando filamentos longos dentro do eritrócito. Esses filamentos aumentam a rigidez celular e alteram a conformação da membrana, resultando em falcização, falência energética celular, estresse oxidativo, desidratação e, por fim, comprometimento do fluxo sanguíneo e hemólise prematura (Sundd; Gladwin; Novelli, 2019).

2.3.2. Vaso-oclusão

Em decorrência da polimerização e a formação de feixes intracelulares no eritrócito, a célula assume formato de foice, com prejuízo a passagem na microvasculatura, gerando um bloqueio e, consequentemente, a hipoxemia tecidual local (figura 2b). Entretanto, apenas a falcização não garante todo o enredo de desenvolvimento do processo de vaso-oclusão. Outros fatores como a ativação endotelial, inflamação, desregulação do óxido nítrico e adesão celular contribuem para este processo (Williams; Thein, 2018).

Devido à fragilidade da membrana dos eritrócitos e, consequentemente, à hemólise, ocorre a liberação do grupamento heme, que prejudica os parâmetros reológicos do sangue, esgota a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e ativa citocinas pró-inflamatórias no endotélio vascular. A reologia, influenciada pelo hematócrito, viscosidade do plasma e deformabilidade dos eritrócitos, é comprometida pela hemólise e pela diminuição da plasticidade dos eritrócitos. Esses elementos sequestram o NO, promovendo a formação de oxidantes prejudiciais, como peroxinitrito ($ONOO^-$) e dióxido de nitrogênio (NO_2). Além disso, a liberação de arginase-1 reduz a disponibilidade de L-arginina, substrato essencial para a síntese de NO pelo óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), intensificando a vasoconstrição e a disfunção vascular (Nader *et al*., 2021; Voskou *et al*., 2015).

Os neutrófilos possuem papel crucial no processo de vaso-oclusão (VO), por meio de suas interações com os eritrócitos e o endotélio. Esse mecanismo envolve a ativação das células endoteliais, que aumenta a expressão de moléculas de adesão, como as P- e E-selectinas, a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1). Os fatores que promovem essa ativação incluem elementos endógenos, como a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos (TNF-α, IL-6, IL1-β e IL-3), e fatores exógenos, como antígenos microbianos (Sundd; Gladwin; Novelli, 2019; Williams; Thein, 2018). Atualmente sabe-se que as CVO podem ser intensificadas por processos inflamatórios, infecciosos e desencadeados por estímulos ambientais (temperatura), hipóxia, desidratação, acidose e outros fatores (Délicat-Loembet *et al*., 2023; Kirkham *et al.,* 2023; Novelli; Gladwin, 2016; Obeagu, 2024).

2.3.3. Disfunção endotelial

A disfunção endotelial na AF é um processo multifatorial que se desenvolve principalmente em resposta à hemólise intravascular crônica. Os eritrócitos falcizados, por apresentarem rigidez e baixa deformabilidade, promovem lesões progressivas na parede dos vasos (Zhang *et al*; 2020). Durante os episódios de hemólise, ocorre a liberação de Hb livre e grupamento heme na circulação, que se ligam rapidamente ao NO, essencial para a homeostase vascular. Essa ligação reduz significativamente a disponibilidade de NO, comprometendo sua função vasodilatadora, o que favorece a vasoconstrição e o aumento da adesão celular ao endotélio (Schaer *et al*., 2016; Sundd; Gladwin; Novelli, 2019).

Um dos mecanismos mais críticos nesse processo é a reação entre a oxi-hemoglobina (oxi-Hb) e o NO, que ocorre de forma extremamente rápida e irreversível, resultando na formação de nitrato inerte (NO_3^-) e metemoglobina (MetHb), conforme ilustrado na Figura 2c. A esse cenário soma-se à elevação da atividade da enzima arginase, que compete com a eNOS pela L-arginina, e o aumento dos níveis de dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor endógeno da eNOS. Essas alterações limitam ainda mais a síntese de NO e levam à ativação do endotélio, estimulando a expressão de moléculas de adesão, como VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), P-selectina e E-selectina. Esse ambiente favorece a adesão de leucócitos e

eritrócitos à parede endotelial, contribuindo para oclusões vasculares (Novelli; Gladwin, 2016; Obeagu, 2024).

Além disso, o estresse oxidativo intensifica a disfunção endotelial. As ERO, produzidas em excesso devido à hemólise e à inflamação, reagem com o NO formando peroxinitrito ($ONOO^-$), um agente altamente reativo e tóxico. Esse composto, por sua vez, induz o desacoplamento da eNOS, fazendo com que a enzima passe a gerar superóxido em vez de NO, agravando ainda mais os danos vasculares. O desequilíbrio redox afeta também alvos intracelulares da via do NO, como a guanilil ciclase solúvel, cuja oxidação compromete a sinalização vasodilatadora normal. A Hb livre oriunda da hemólise é, portanto, um dos principais indutores desse estado oxidativo, e contribui diretamente para a alteração da biodisponibilidade de NO (Novelli; Gladwin, 2016; Obeagu, 2024; Sundd; Gladwin; Novelli, 2019).

2.3.4. Inflamação estéril

O evento de CVO, reforça a isquemia-reperfusão, que junto à liberação dos padrões moleculares associados a danos (eDAMPS) promove a progressão da inflamação estéril, isto é, a ativação de células pró-inflamatórias sem ação patógena como de bactérias ou vírus. Adicionalmente, o grupamento heme e sua forma oxidada, liberadas após a oxidação da Hb, atuam como agonistas do receptor TLR4 que gera um estado pró-inflamatório e pró-coagulante (Figura 2d). Além disso, há a ativação de leucócitos, plaquetas, de células endoteliais, liberação de citocinas inflamatórias e aumento da geração de oxidantes. (Sundd; Gladwin; Novelli, 2019; Williams; Thein, 2018)

A ativação de neutrófilos, nesse momento, gera armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), que são estruturas semelhantes a malhas de cromatina descondensada com proteases de neutrófilos e histonas citrulinadas (Figura 2d). As NETs, quando formadas, acarretam diversas condições inflamatórias e promovem a ativação de respostas imunitárias inatas, conduzindo a lesões nos tecidos. Os eventos sequenciais de CVO intensificam a lesão de isquemia-reperfusão, gerando hipóxia transitória, agentes oxidantes, disfunção microvascular e a ativação de respostas inatas, adaptativas e morte celular (Sundd; Gladwin; Novelli, 2019; Ware et al., 2017).

2.4. Eventos clínicos associados a vaso-oclusão na anemia falciforme

A dor é uma causa significativa de morbidade em pacientes com DF, podendo se manifestar tanto como uma dor aguda e intermitente quanto uma dor crônica (Brandow *et al*., 2020). A dor aguda, também referida como crise de dor na DF, é associada a episódios imprevisíveis de CVO e fornecimento prejudicado de oxigênio; sendo a causa mais comum de hospitalização em pacientes com a doença, representando 95% dos casos (Williams; Thein, 2018).

Os sintomas relacionados a CVO surgem desde os primeiros meses de vida com desfechos importantes que não acometem apenas a dor, mas também problemas clínicos, como acidente vascular encefálico (AVE), síndrome torácica aguda (STA) e sequestro esplênico (Ballas; Darbari, 2020).

O AVE é uma das complicações mais graves associadas às CVO na DF, sendo estimado que cerca de 11% dos pacientes desenvolvam um episódio até os 20 anos de idade. Essa ocorrência resulta de mecanismos fisiopatológicos centrais da doença, que incluem, além da VO, a hemólise crônica e a inflamação, os quais promovem alterações no fluxo sanguíneo cerebral e contribuem para o desenvolvimento de vasculopatia (Hakami *et al.,* 2023).

A STA é uma das complicações mais graves decorrentes da CVO e pode ser definida como uma lesão pulmonar aguda, desencadeada por processos infecciosos (como pneumonia bacteriana) ou não infecciosos. Essa condição pode evoluir para insuficiência respiratória, requerer hospitalização e, em casos mais severos, levar ao óbito (Koehl *et al*., 2022; Novelli; Gladwin, 2016). A VO da microvasculatura pulmonar reduz os níveis de oxigênio alveolar e eleva a taxa de polimerização da HbS, resultando em isquemia e lesão endotelial. Como consequência, ocorre dessaturação do sangue sistêmico e hipóxia, o que intensifica a falcização eritrocitária. Esse processo estabelece um ciclo de retroalimentação que agrava a inflamação, o dano endotelial e favorece novos eventos de CVO. (Koehl *et al*., 2022).

O diagnóstico da STA representa um desafio clínico, visto que seus sinais e sintomas se assemelham aos da pneumonia aguda, incluindo tosse, dispneia, consolidação pulmonar e hipoxemia. Além disso, episódios agudos de dor podem

surgir isoladamente, com quadros clínicos mais graves que, por vezes, requerem intervenções cirúrgicas, especialmente na região abdominal (Williams; Thein, 2018).

Outra complicação grave que acomete indivíduos com AF é o sequestro esplênico, observado com maior frequência na infância, especialmente associado ao hipoesplenismo antes dos 12 meses de idade. O processo recorrente de VO no baço promove fibrose progressiva e atrofia do órgão, culminando em autoesplenectomia. Esse fenômeno decorre do aprisionamento maciço de eritrócitos na circulação esplênica, resultando em uma queda aguda dos níveis de hemoglobina (redução >2 g/dL em relação ao valor basal) e aumento do volume do baço, geralmente superior a 2 cm em comparação ao seu tamanho basal (Al-Salem, 2011; Ben Khaled et al., 2020).

2.5. Estresse Oxidativo

A formação de ERO e de espécies reativas de nitrogênio (ERN) é um processo fisiológico natural do metabolismo celular, envolvida em diversas funções biológicas, como a fagocitose de patógenos e a sinalização intracelular (Schieber; Chandel, 2014). Nessas situações, essas espécies são geradas com o objetivo de defender o organismo ou regular processos metabólicos. No entanto, quando sua produção excede a capacidade antioxidante do sistema, seja por disfunções biológicas ou estímulos externos, as ERO/ERN podem provocar danos significativos a biomoléculas essenciais, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e fosfolipídios de membrana, por meio de processos como a peroxidação lipídica (Mary *et al*., 2007). Para manter a homeostase e evitar os efeitos deletérios do estresse oxidativo, o organismo conta com uma complexa rede de defesa antioxidante, composta por enzimas redox como a superóxido dismutase (Sod), catalase (Cat), glutationa peroxidase (Gpx) e outras, que neutralizam essas espécies reativas por meio de reações de oxidorredução altamente reguladas (Schieber; Chandel, 2014).

Além do efeito deletério, ERO e ERN exercem um papel importante como mediadores da sinalização intracelular, participando de processos como a resposta ao estresse oxidativo, vasodilatação e ativação da resposta imune (Schieber; Chandel, 2014). Nessas condições, elevações moderadas na produção dessas espécies, em contexto fisiológico, favorecem a adaptação celular, caracterizando o estado de eustresse (Pisoschi; Pop, 2015; Schieber; Chandel, 2014). Contudo, quando sua produção torna-se excessiva, caracterizando o distresse oxidativo, o

organismo conta com um sistema antioxidante eficiente, capaz de modular esse aumento e restaurar o equilíbrio redox (Finkel; Holbrook, 2000; Schafer; Buettner, 2001).

A homeostase redox, portanto, resulta de um equilíbrio dinâmico entre os processos geradores de espécies reativas, que promovem oxidação de biomoléculas, e os mecanismos de defesa antioxidante que limitam essa produção (Jones; Sies, 2015). Esse equilíbrio pode ser regulado tanto pela atividade das enzimas antioxidantes quanto por mecanismos em nível transcricional (Sies; Berndt; Jones, 2017; Allen; Tresini, 2000).

2.6. Regulação Redox Eritrocitária na Anemia Falciforme

Nos eritrócitos falciformes, a HbS é uma molécula propensa a auto-oxidação que ocasiona a produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), molécula que é capaz de atacar diretamente a membrana dessas células causando alterações nos lipídíos e na estrutura das proteínas, considerado um gatilho importante do processo oxidativo (Voskou *et al*., 2015). Esse ânion sofre dismutação e gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2), composto capaz de oxidar tióis de proteínas (Kanias; Acker, 2010). Por sua vez, o H_2O_2 pode reagir com metais como o ferro dando origem ao radical hidroxila (•OH), que é extremamente reativo e ataca rapidamente as biomoléculas no local onde é formado (Jomova; Baros; Valko, 2012; Salgado *et al*., 2013). Dessa maneira, a auto oxidação da HbS constitui uma das maiores fontes de geração interna de fontes oxidantes (Barabino *et al*., 2010; Van Zwieten *et al*., 2014).

Todo esse conjunto de reações oxidativas, desencadeado pela auto-oxidação da HbS, caracteriza um sistema pró-oxidante altamente ativo no interior dos eritrócitos falciformes. A produção constante e exacerbada de ERO impõe uma demanda elevada sobre os mecanismos antioxidantes celulares, promovendo um consumo acelerado desses agentes de defesa. Como consequência, instala-se um estado de estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre a geração de oxidantes e a capacidade antioxidante disponível. Para conter esse dano, os eritrócitos contam com um sistema de detoxificação bem estruturado, composto por componentes enzimáticos, como as enzimas Sod, Cat, Gpx, Gr e por componentes não enzimáticos, como glutationa reduzida (GSH) e vitamina E, que atuam de forma integrada na

neutralização dos radicais livres e na preservação da integridade celular (Silva *et al*., 2013).

O sistema antioxidante enzimático presente no citoplasma dos eritrócitos desempenha papel essencial na neutralização das ERO, contribuindo para a manutenção da homeostase redox (Figura 3). A defesa inicia-se com a ação da superóxido dismutase 1 (Sod1), que catalisa a conversão do $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2. Em seguida, o H_2O_2 pode ser eliminado por duas vias principais: pela Cat, que o decompõe diretamente em água e oxigênio, ou pela Gpx1, que utiliza a GSH como cofator para reduzir peróxidos, incluindo o H_2O_2 e outros hidroperóxidos celulares. Atuando de forma complementar, a glutationa S-transferase (GST) promove a conjugação de GSH com compostos eletrofílicos e subprodutos tóxicos da peroxidação lipídica, contribuindo para a neutralização dessas moléculas e evitando danos às proteínas da membrana eritrocitária. A GST pode catalisar a S-glutationilação de resíduos de cisteína na hemoglobina, protegendo esses grupos contra oxidações irreversíveis e, após desglutationilação, contribuindo para a manutenção da forma funcional reduzida da molécula, reforçando assim a defesa antioxidante intracelular (Scirè *et al*., 2023).

Em condições de estresse oxidativo mais acentuado, há um aumento na formação de glutationa dissulfeto (GSSG), que representa a forma oxidada da GSH. Para evitar a depleção do potencial redutor intracelular, a GSSG é regenerada em GSH por meio da ação da glutationa redutase (Gr), em uma reação dependente de NADPH como doador de elétrons. Esse mesmo NADPH também é utilizado pelo sistema redutor da tioredoxina, composto pela tioredoxina (Trx) e pela tioredoxina redutase (TrxR). Esse sistema atua na eliminação de ERO por meio de grupos funcionais do tipo tiol e selenol, reforçando a resposta antioxidante celular. A figura 3 apresenta um esquema representando essas principais vias enzimáticas de defesa antioxidante nos eritrócitos (Bernardo *et al*., 2025a; Kuhn *et al*., 2017).

Vale destacar que a busca pela homeostase entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes ocorre tanto em eritrócitos saudáveis quanto em eritrócitos falciformes. A principal diferença reside no fato de que, na AF, há um aumento significativo na produção de espécies reativas, o que leva a um desequilíbrio no sistema redox intracelular. Esse estado redox desregulado impõe uma demanda elevada por

mecanismos antioxidantes, que nem sempre são suficientes para neutralizar o excesso de oxidantes. Como consequência, esse desequilíbrio contribui para o desencadeamento de alterações fisiopatológicas importantes, culminando em manifestações clínicas características da doença falciforme (Silva *et al*., 2013).

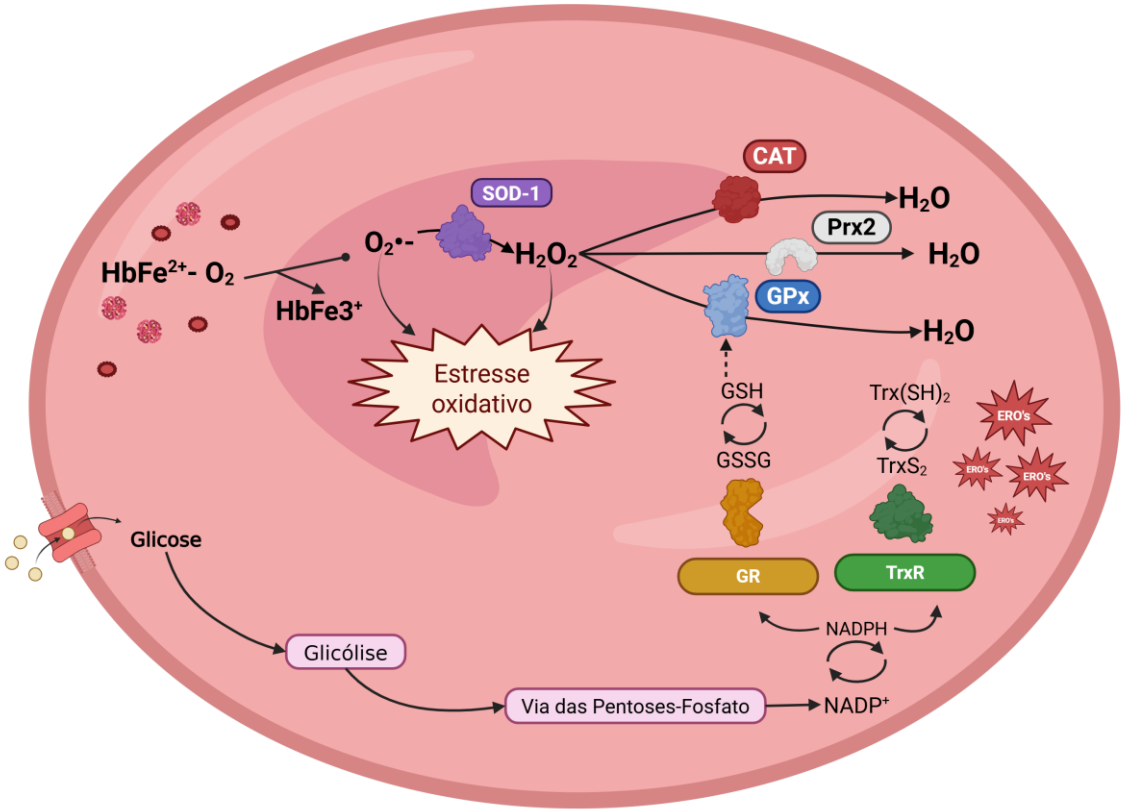


Figura 3. Regulação redox nos eritrócitos. A geração contínua de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas hemácias ocorre principalmente pela oxidação do grupo heme da oxi-hemoglobina ($HbFe^{2+}$-O_2) em metemoglobina ($HbFe^{3+}$), processo que também libera ânions superóxido (O_2•$^-$) como resultado da autoxidação da hemoglobina. A enzima superóxido dismutase 1 (sod1) converte os ânions O_2•$^-$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode ser neutralizado por três vias principais. As vias dependentes da glutationa peroxidase (GPx) e da peroxirredoxina 2 (Prx2) requerem NADPH reduzido como cofator, enquanto a via catalisada pela catalase (Cat) atua independentemente desse cofator. O NADPH é gerado a partir da captação de glicose pelas hemácias via transportador Glut-1, seguida pela glicólise e pelo desvio de parte da glicose-6-fosfato para a via das pentoses-fosfato. A glutationa redutase (Gr) utiliza NADPH para regenerar glutationa reduzida (GSH) a partir da forma oxidada (GSSG), e a GSH é utilizada pela GPx para decompor o H_2O_2. A tiorredoxina redutase (TrxR), também dependente de NADPH, mantém a tiorredoxina (Trx) em sua forma reduzida [Trx $(SH)_2$], essencial para a ação da Prx2. Esses sistemas antioxidantes são fundamentais para manter a homeostase redox e prevenir os danos provocados pelo acúmulo de ERO no ambiente intracelular. Fonte: Modificado de Kuhn *Et al* (2017), adaptando imagens do BioRender.

O dano oxidativo compromete componentes essenciais do citoesqueleto eritrocitário, como a espectrina, levando à oxidação dessas proteínas e ao enfraquecimento da membrana plasmática das hemácias falciformes. Esse processo aumenta a fragilidade celular e favorece a hemólise. A hemólise, por sua vez, está

intimamente relacionada à ativação e adesão das hemácias ao endotélio vascular, fenômeno que contribui para a ocorrência de eventos VO. Esses eventos resultam em episódios recorrentes de dor e podem causar lesões progressivas em diversos órgãos. Além de comprometer a integridade celular, o estresse oxidativo também induz um estado de inflamação sistêmica, amplificado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias que estabelecem um ciclo de retroalimentação positiva. Esse mecanismo perpetua o dano tecidual, contribuindo tanto para lesões agudas quanto para alterações crônicas em órgãos-alvo. Paralelamente, o excesso de espécies reativas também interfere no metabolismo energético das hemácias, afetando de forma significativa rotas metabólicas fundamentais, como a glicólise e a via das pentoses fosfato, o que compromete a geração de energia e a manutenção da defesa antioxidante intracelular (Aslan *et al*., 2015; Van Zwieten; Verhoeven; Roos, 2014).

O estresse oxidativo desempenha um papel central nas complicações da AF, sendo estimulado pela NADPH oxidase, que desencadeia a produção de ERO. Nesse processo, NADPH é consumido, o que resulta na incapacidade do eritrócito de manter adequadamente defesas antioxidantes (Akram *et al*., 2019; Di Pierro et al., 2020).

2.7. Via NRF2 e o Estresse Oxidativo

A via transcricional NRF2-ARE é um regulador essencial de enzimas de detoxificação, estimulada por eletrofílicos e ERO, sendo essencial para os mecanismos de defesa celular contra o estresse oxidativo, elevando a taxa de expressão de genes antioxidantes, visando manter a homeostase redox em condições adversas, como por exemplo em patologias como o câncer, a AF e na desintoxicação de substâncias xenobióticos. (Li *et al*., 2023; Motohashi; Yamamoto, 2004)

A proteína NRF2 (Fator Nuclear Eritroide 2-Relacionado ao Fator 2) atua como fator de transcrição para a ativação de genes. Contudo, em momentos de eustresse, ou seja, quando a demanda fisiológica por genes antioxidantes é menor, o NRF2 se mantém em baixos níveis citoplasmáticos pela união com uma outra proteína, o Keap1 (Proteína 1 associada à ECH tipo Kelch), que junto à Cul3 (Cullin-3) forma um complexo com a ligase E3 de ubiquitina que promove a poliubiquitinação do NRF2. Essa poliubiquitinação sinaliza para o meio celular que não há necessidade de maior demanda de expressão gênica (figura 4a), logo, o fator de transcrição é degradado

via proteassoma, garantindo um equilíbrio na produção de enzimas antioxidantes das células (Niture; Khatri; Jaiswal, 2014; Suzuki; Yamamoto, 2015).

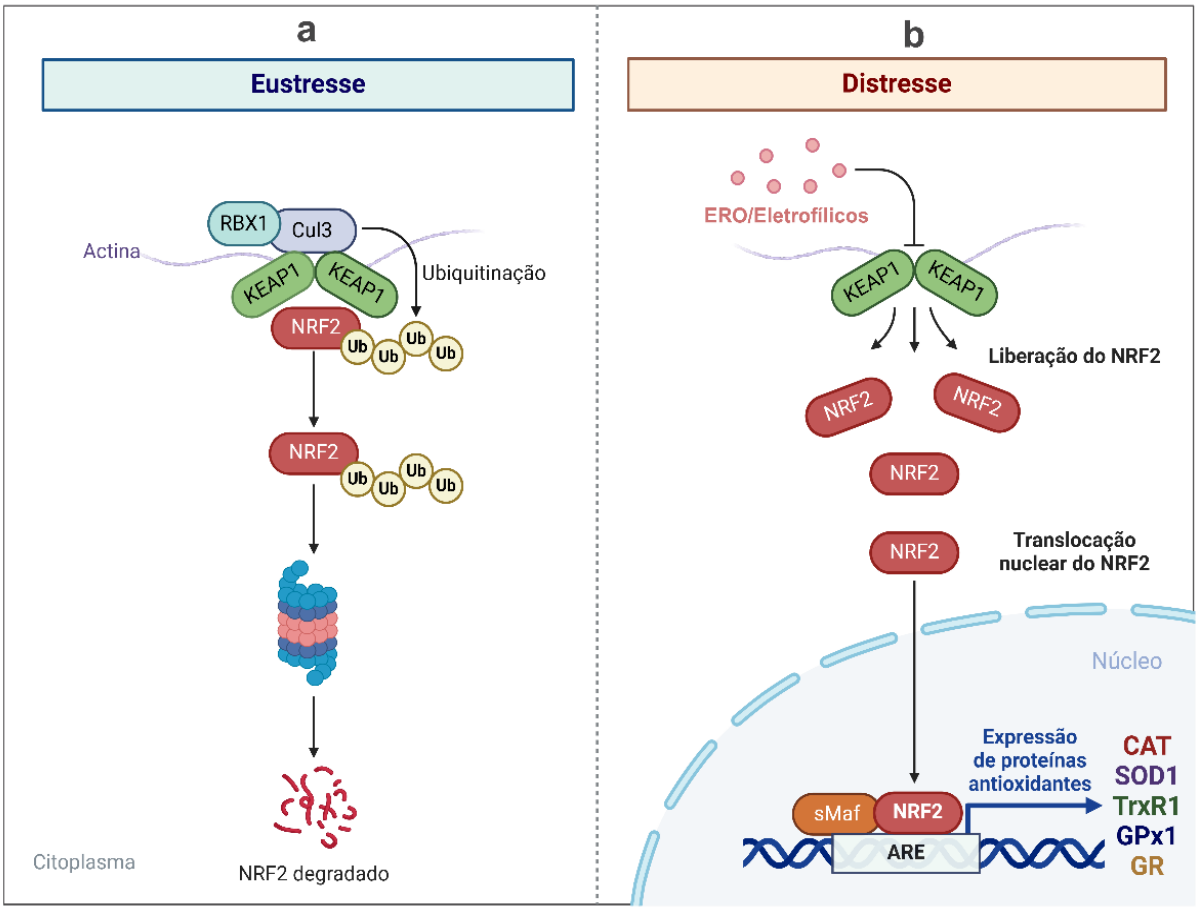


Figura 4. Via Nrf2-Keap1- ARE para sinalização de respostas celulares ao estresse oxidativo. Em condições normais, sem estresse oxidativo, o NRF2 permanece inativo, ligado ao seu inibidor endógeno Keap1. Nessa situação, seus níveis são controlados principalmente pelo sistema proteassoma. Sob estresse oxidativo, o NRF2 se dissocia de Keap1 e migra para o núcleo, onde forma um heterodímero com sMaf. O complexo NRF2-Maf então se liga aos elementos de resposta antioxidante (ARE), ativando a expressão de genes antioxidantes e metabólicos. Criado em BioRender pelo próprio autor.

Entretanto, em momentos de distresse, ou seja, em condições de exacerbação de ERO, xenobióticos e de compostos eletrofílicos, a demanda pela expressão de genes faz com que haja a translocação do NRF2 para o núcleo. Esse evento ocorre inicialmente com uma interação específica em sítios de cisteína (Cys^{151}, Cys^{273} e Cys^{288}) do Keap1, que reduz a atividade da ligase E3 de ubiquitina no complexo KEAP1-CUL3, levando à desestabilização do NRF2 (Yamamoto; Kensler; Motohashi, 2018).

Nesse momento, o fator de transcrição pode então translocar-se ao núcleo, onde forma um heterodímero com uma das proteínas da família fibrossarcoma músculo-aponeurótico pequena (sMAF), que, posteriormente irá ligar-se ao ARE e ativar ampla bateria de genes de fase II (Figura 4b). Destaca-se a NAD(P)H:quinona oxidoredutase 1 (*NQO1*), que reduz quinonas; a heme oxigenase 1 (*HMOX1*), responsável pela degradação do heme, a glutationa cisteína ligase catalítica (*GCLC*) e a glutationa cisteína ligase moduladora (*GCLM*), ambas essenciais para a síntese de glutationa, a glutationa peroxidase 1 (*GPX1*), que reduz hidroperóxidos, a catalase (*CAT*), que decompõe peróxido de hidrogênio, e a superóxido dismutase 1 (*SOD1*), que converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio; a glutationa S-transferase (*GSTO*), que conjugam glutationa a compostos reativos; tiorredoxina (TrX), regenerada pela tiorredoxina redutase 1 (*TXNRD1*), e a glutationa redutase (*GSR*), que regenera a glutationa reduzida (GSH). Essas enzimas e seus respectivos genes, em conjunto, formam uma defesa contra danos oxidativos e químicos (Baird; Dinkova-Kostova, 2011; Liu; Pi; Zhang, 2022; Suzuki; Takahashi; Yamamoto, 2023).

O estudo de Keleku-Lukwete *et al*; (2015) demonstrou que, em modelos murinos *knock-in* com AF, a ativação moderada do fator de transcrição NRF2, por meio da redução parcial de seu regulador negativo Keap1, promove efeitos protetores significativos. Essa modulação resultou na redução do dano hepático, incluindo necrose e níveis elevados de alanina aminotransferase (ALT), quando comparada a camundongos controle. Por outro lado, a deleção total de Keap1 levou ao desenvolvimento de consequências graves, como hiperqueratose e aumento da mortalidade, sugerindo que a ativação excessiva da via também pode ser deletéria. Os modelos utilizados no estudo incluíram camundongos com genótipo HbSS::Keap1, que representam animais geneticamente modificados para expressar HbS humana em homozigose (HbSS) e que também possuem alterações específicas no gene Keap1, onde os murinos possuíram um alelo hipomórfico floxado ($Keap1^{F}$) e um alelo nulo ($Keap1^{-}$), reduzindo a expressão do principal inibidor do NRF2. Curiosamente, mesmo diante de um ambiente com elevado estresse oxidativo, os camundongos hbSS::Keap1 não apresentaram uma ativação endógena robusta da via NRF2, indicando que uma ativação exógena, controlada e transitória, pode ser mais eficaz na proteção tecidual e na redução da inflamação associada à AF.

Diante do papel central da via NRF2-ARE na indução coordenada de genes antioxidantes envolvidos na neutralização de espécies reativas e na manutenção da homeostase redox, o presente estudo partiu da hipótese de que indivíduos com maior frequência de CVO apresentariam um aumento compensatório na expressão de genes antioxidantes, bem como nas atividades enzimáticas associadas, como resposta adaptativa ao estresse oxidativo. Assim, seria esperado que, frente a um ambiente celular persistentemente pró-oxidante, houvesse um reforço do sistema de defesa antioxidante, refletido em níveis aumentados de transcritos e maior atividade funcional de enzimas. Por outro lado, indivíduos com menos CVO tenderiam a apresentar menor ativação dessa resposta, corroborando com um ambiente redox menos estressado. Ao investigar esse padrão, o estudo visa compreender se a ativação da via NRF2-ARE, em humanos com AF, ocorre de forma proporcional à frequência de CVO, contribuindo para elucidar os limites adaptativos desse sistema.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral.

Investigar a contribuição da via NRF2-ARE no processo de adaptação redox celular em pessoas com AF com e sem crises vaso oclusivas.

3.2. Específicos.

- Analisar a expressão do gene *NFE2L2* em pessoas com AF;
- Analisar a expressão dos genes com elementos de resposta antioxidante (ARE): catalase (*CAT*), glutationa peroxidase (*GPX1*), glutationa redutase (*GRS*), tioredoxina redutase (*TRXNRD1*) e superóxido dismutase-1 (*SOD1*) em pessoas com AF;
- Avaliar a atividade enzimática de antioxidantes (CAT, GPx, GR, GST e G6PD) em pessoas com AF;
- Correlacionar a expressão do gene *NFE2L2* e o perfil antioxidante eritrocitário em diferentes condições de crises vaso oclusivas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Casuística

A coorte do estudo foi composta por 25 pessoas com AF, com idades entre 18 e 40 anos, de ambos os gêneros, provenientes do Hemocentro do Maranhão (HEMOMAR). Trata-se de um estudo observacional, analítico e transversal, com abordagem quantitativa.

Foram estabelecidos como critérios de inclusão: diagnóstico de AF (HbSS), níveis de hemoglobina A (HbA) inferiores a 10%, sem histórico de processos infecciosos, sem ocorrência de acidente vascular encefálico (AVE) ou síndrome torácica aguda (STA) nos dois meses que antecederam a coleta.

Foram excluídos do estudo indivíduos com idade inferior a 18 anos, fumantes, gestantes e aqueles que relataram consumo de bebidas alcoólicas, antibióticos, ácido acetilsalicílico, analgésicos, quelantes de ferro ou suplementos vitamínicos nas 48 horas que antecederam a coleta. Adicionalmente, foram excluídos pacientes com diagnóstico de β-talassemia ou α-talassemia em homozigose ($-\alpha^{3\cdot7}/-\alpha^{3\cdot7}$), níveis de hemoglobina A (HbA0) superiores a 10%, histórico de transfusão sanguínea nos 120 dias anteriores a data da coleta ou uso crônico de opioides.

Os participantes foram separados em três grupos conforme as frequências de crises de dor no último ano precedente a data de coleta de sangue: Grupo 1, constituído por 14 pessoas com AF e ausência de crises de dor (grupo sem crise – SC); Grupo 2, composto por 7 pacientes com baixa frequência de crises (BFC), definida pela ocorrência de uma a duas crises de dor, e, Grupo 3, formado por 4 pacientes com alta frequência de crises (AFC), caracterizada por seis eventos de crise vaso-oclusiva. Os pacientes considerados com crises de dor foram aqueles que demandaram atendimento médico para o controle da dor.

A caracterização do grupo de estudo, conforme as variáveis e os critérios de inclusão/exclusão, pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização dos grupos quanto às variáveis demográficas, genéticas e hematológicas.

Variáveis	SC (n = 14)	BFC (n =7)	AFC (n = 4)	Valor de *p*
	N (%)	N (%)	N (%)	
Alfa talassemia				
-α$^{3.7}$/αα	5 (35,70)	0 (0,00)	2 (50,00)	0,129
αα/αα	9 (64,30)	7 (100,00)	2 (50,00)	
Gênero				
Masculino	5 (35,70)	3 (42,86)	4 (100,00)	0,072
Feminino	9 (64,30)	4 (57,14)	0 (00,00)	
Hidroxiureia				
Sim	10 (71,40)	6 (85,71)	2 (50,00)	0,446
Não	4 (28,60)	1(14,29)	2 (50,00)	
	Média (± DP)	**Média (± DP)**	**Média (± DP)**	
Hb S (%)	80,57 (8,06)	77,17 (5,93)	73,50 (9,84)	0,265
Hb F (%)	9,82 (8,46)	12,68 (8,16)	12,60 (5,67)	0,689
Hb A0 (%)	2,40 (2,46)	1,82 (0,75)	3,27 (3,84)	0,621
Eritrócitos (milhões/mm^3)	2,78 (0,77)	2,72 (0,39)	2,19 (0,42)	0,285
Hb (g/dL)	9,24 (1,41)	9,24 (0,90)	7,57 (0,61)	0,060
Hematócrito (%)	27,40 (4,51)	27,58 (3,74)	21,92 (2,85)	0,068
VCM (fl)	101.51 (15,40)	101,81 (12,51)	101,45 (13,46)	0,999
HCM (pg)	34,32 (5,48)	34,30 (4,72)	35,27 (4,62)	0,944
CHCM (g/dL)	33,77 (0,92)	33,68 (1,76)	34,82 (2,00)	0,371
RDW (%)	20,70 (2,90)	21,78 (3,36)	22,87 (2,40)	0,372
Leucócitos (mm^3)	8.395 (3.199)	8.225 (3.053)	8.460 (2.128)	0,990
Neutrófilos (mm^3)	50,97 (7,16)	56,80 (13,33)	57,07 (8,51)	0,315
	Mediana (Intervalo)	**Mediana (Intervalo)**	**Mediana (Intervalo)**	
Idade (anos)	24,00 (18-48)	32,00 (19-40)	22,00 (20-22)	0,388

As variáveis quantitativas foram comparadas entre os três grupos utilizando a análise de variância de uma via (*One-Way ANOVA*) para os dados paramétricos e o teste de Kruskall-Walis para os dados não-paramétricos. As variáveis qualitativas foram comparadas utilizando o teste de Qui-quadrado de Pearson (χ^2). SC, sem crises vaso-oclusivas ao ano; BFC, baixa frequência de crises vaso-oclusivas ao ano; AFC, alta frequência de crises vaso-oclusivas ao ano; HU, hidroxiureia; HbS, hemoglobina S; Hb F, hemoglobina fetal; Hb, hemoglobina total; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração da hemoglobina corpuscular média; RDW, amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (*red cell distribution width*); VCM, volume corpuscular médio; Hb A0, hemoglobina A normal; DP, desvio-padrão.

4.2. Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, sob o protocolo n.º 83/022.625/2023 e Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) n.º 77279623.2.0000.0021 (Anexo 1). Antes da coleta de amostras (que consistiu em dois tubos de EDTA a 5% por um profissional autorizado), foram aplicados o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o Questionário Clínico de Pesquisa, ambos detalhados nos Apêndices 1 e 2.

4.3. Métodos

4.3.1. Diagnóstico da anemia falciforme e caracterização dos grupos de estudo

O diagnóstico da AF e exclusão de outras hemoglobinopatias foram realizados por procedimentos cromatográficos e por análises de biologia molecular detalhados a seguir:

4.3.2. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

O sistema Ultra2 (*Trinity Biotech*) com o Kit de análise *Resolution no modo High Resolution* foi utilizado para quantificação das Hb anormais e normais (HbA, HbS, HbF e HbA2). A quantificação das frações globínicas foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), conforme as recomendações do fabricante. O sistema baseou-se na cromatografia de troca iônica em um sistema semiaberto, no qual as amostras são detectadas por absorbância a 413 nm. Os dados gerados pelo detector foram processados e apresentados em um relatório da amostra, com base nos tempos de retenção relativos. Esses tempos foram comparados a uma solução padrão de hemoglobinas previamente injetada no sistema, que contém Hb F, Hb A, Hb S e Hb C. Esse padrão servia de referência para a identificação e quantificação das diferentes frações globínicas presentes nas amostras analisadas.

4.3.3. Extração de DNA

O método utilizado para a extração de DNA genômico de sangue periférico baseou-se no uso de fenol/clorofórmio e na precipitação com etanol (Sambrook; Fritcsh; Manatis, 1989).

Durante o procedimento, as proteínas contaminantes foram desnaturadas e retidas na fase orgânica ou na interface entre as fases orgânica e aquosa, enquanto os ácidos nucléicos permaneceram na fase aquosa. Para otimizar o processo, foi adicionado álcool isoamilico ao fenol/clorofórmio durante a extração.

A precipitação do DNA foi promovida pela adição de etanol, que manteve os sais e outros solutos, como resíduos do fenol/clorofórmio, dissolvidos na solução, permitindo que os ácidos nucléicos se precipitassem e fossem isolados por centrifugação.

O DNA obtido por esse método apresentou qualidade adequada para aplicações em técnicas de biologia molecular, como a amplificação por PCR.

4.3.4. Análise molecular para Hb S por PCR-RFLP

A detecção da mutação foi realizada por meio de PCR seguido de análise de restrição, conforme descrito por outros autores (Belini-Junior; Cançado; Domingos, 2010; Saiki *et al.*, 1985).

Após a amplificação da região de interesse envolvendo o sexto códon do gene, o fragmento amplificado, com tamanho de 382 pares de bases (pb), foi submetido à digestão enzimática utilizando a enzima Fast Digest DdeI a 37 °C durante 5 minutos. Na presença da mutação característica da Hb S, ocorreu a eliminação do sítio de restrição para a enzima DdeI, resultando na formação de fragmentos de 288 pb, 88 pb e 6 pb (este último não visualizado em gel de agarose). Na ausência da mutação, a digestão gerou fragmentos de 201 pb, 88 pb, 87 pb e 6 pb.

4.3.5. Análise molecular para alfa talassemia (-α 3.7Kb) por GAP-PCR

A determinação da mutação -α $^{3.7Kb}$ foi realizada por meio da técnica de GAP-PCR, que detectou a deleção de 3.700 pares de bases (pb) no *cluster* da alfa-globina (Dode *et al.*, 1993).

Para isso, foram utilizados *primers* específicos que flanqueavam a região deletada e uma região controle sem deleção, permitindo a amplificação de fragmentos de tamanhos distintos. O fragmento curto, com aproximadamente 1.841 pb, foi gerado pela deleção e indicava a presença do alelo -α $^{3.7Kb}$, enquanto o fragmento longo, com 2.165 pb, correspondia ao alelo normal. Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,2%, permitindo a separação e visualização dos fragmentos. Os indivíduos homozigotos normais apresentaram apenas o fragmento longo de 2.165 pb; os indivíduos heterozigotos para a deleção exibiram ambos os fragmentos (2.165 pb e 1.841 pb); e os indivíduos homozigotos para a deleção apresentaram exclusivamente o fragmento curto de 1.841 pb

4.4. Expressão gênica do *NFE2L2* e genes antioxidantes

4.4.1. Separação de reticulócitos, obtenção e avaliação da concentração e pureza do RNA

Para a obtenção dos reticulócitos, as amostras foram processadas conforme o protocolo do *New York Blood Center* para separação de reticulócitos a partir de sangue periférico (Apêndice 3), seguido da extração de RNA utilizando o kit *PureLink*® RNA Mini Kit (Thermo Fisher *Scientific*), conforme as instruções do fabricante (12183018A; *Invitrogen*™). As concentrações de RNA total isolado e purificado foram determinadas por espectrofotometria, com o uso do equipamento *NanoPhotometer*® N60 (*Implen*).

Em seguida, uma alíquota do RNA foi submetida à técnica de eletroforese horizontal, empregada para avaliar a integridade do RNA ribossomal (rRNA). Essa técnica permite a visualização das bandas de rRNA, que servem como indicativo da qualidade do RNA mensageiro (RNAm), assumindo-se que este possua integridade semelhante à do rRNA. A análise da integridade do rRNA de alguns dos pacientes incluídos no estudo encontra-se apresentada no Apêndice 4.

4.4.2. Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada pelo *Kit High Capacity* cDNA *Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems*™) com 5 µg do RNA total, utilizando hexâmeros aleatórios de oligonucleotídeo iniciador (dT)18 e uma transcriptase reversa, conforme as instruções do fabricante. Para verificar a eficiência da reação da transcriptase reversa em sintetizar moléculas de cDNA, foi realizada uma amplificação por qPCR-RT utilizando iniciadores para o gene endógeno beta actina (*ACTB*).

4.4.3. Análise de expressão gênica do *NFE2L2* e genes envolvidos na resposta antioxidante

A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) associado ao uso de sondas TaqMan® (*Applied Biosystems*™). Os *primers* foram adquiridos a partir de ensaios disponibilizados pelo fabricante, com os seguintes códigos: Hs00829989_gH (*GPX1*); Hs00975961_g1 (*NFE2L2*); Hs00533490_m1 (*SOD1*); Hs00917067_m1(*TRXNRD1*); Hs00167317_m1(*GSR*) e Hs00156308_m1(*CAT*). O gene da beta-actina (*ACTB*), de código Hs01060665_g1, foi utilizado como controle endógeno. A quantificação dos resultados baseou-se na derivação da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmitttgen, 2001). As amostras estudadas

tiveram a expressão relativa determinada. Os dados de Ct foram exportados para uma planilha no programa Excel (*Microsoft Corporation*) e, então, analisados. O ΔCt foi calculado utilizando as diferenças na média de Ct entre os genes alvos e seus controles endógenos. Posteriormente, o -ΔΔCt foi calculado em relação a uma situação considerada como referência, que constituiu a amostra calibradora. Por fim, foi calculado o $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmitttgen, 2001).

4.5. Análise de atividade enzimática

As atividades enzimáticas da Cat, Gpx, Gr, GST e G6PD foram determinadas por métodos espectrofotométricos (Evolution 201 Spectrophotometer, *Thermo Scientific*), utilizando hemolisado de sangue total.

4.5.1. Avaliação de atividade enzimática da catalase

A atividade da Cat foi quantificada segundo o método descrito por Beutler (1975), baseado na decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima, com monitoramento da redução da absorbância em 240 nm.

4.5.2. Avaliação de atividade enzimática da glutationa peroxidase

A GPx foi avaliada conforme descrito por Sies (1979), utilizando o hidroperóxido de terc-butila (tBOOH) como substrato. A atividade foi inferida indiretamente pelo consumo de NADPH em um sistema acoplado com a GR, acompanhado pela diminuição da absorbância em 340 nm.

4.5.3. Avaliação de atividade enzimática da glutationa redutase

A Gr foi quantificada conforme o método proposto por Beutler (1969), fundamentado na regeneração da glutationa reduzida (GSH) a partir da forma oxidada (GSSG), com consumo de NADPH monitorado em 340 nm.

4.5.4. Avaliação de atividade enzimática da glutationa S transferase

A atividade da GST foi determinada com base no método proposto por Keen *et al.* (1976), que se baseia na conjugação do substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com glutationa reduzida (GSH), formando um produto detectável a 340 nm.

4.5.5. Avaliação de atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase

A atividade da G6PD foi determinada conforme o método descrito por Beutler (1994). O ensaio baseou-se na redução do $NADP^+$ a NADPH em presença de glicose-6-fosfato (G6P), com leitura da absorbância a 340 nm por 3 minutos.

4.5.6. Quantificação da concentração proteica pelo método de Bradford

Após a análise das atividades enzimáticas, realizou-se a quantificação da concentração total de proteínas em cada amostra com o objetivo de normalizar os dados e calcular a atividade específica de cada enzima. Para isso, empregou-se o método de Bradford, conforme protocolo original descrito por Bradford (1976) e adaptado pelo fabricante Bio-Rad® (2024).

Esse método baseia-se na interação do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* com resíduos básicos e aromáticos das proteínas, resultando em um deslocamento do pico de absorbância de 465 nm para 595 nm. A intensidade da coloração azul formada é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra. As leituras foram realizadas a 595 nm, e os valores foram determinados por interpolação em uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de albumina bovina (BSA).

As concentrações proteicas foram utilizadas para a correção dos valores de atividade enzimática, que passaram a ser expressos em miliunidades por miligrama de proteína (mU/mg de proteína), permitindo uma comparação padronizada entre os indivíduos avaliados.

5. Análise de dados

Os dados quantitativos foram avaliados quanto à normalidade, por meio do teste de Shapiro-Wilk, e quanto à homocedasticidade, utilizando o teste de Levene. As variáveis de expressão gênica e atividades enzimáticas foram previamente transformadas logaritmicamente ($\log^{10}$) para melhor adequação às premissas de normalidade e homocedasticidade. Para os dados que atenderam às premissas para a aplicação de testes paramétricos, foi empregada a análise de variância (ANOVA); para os dados que não atenderam a essas premissas, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. As variáveis qualitativas foram comparadas entre os grupos por meio do teste Qui-quadrado de Pearson (χ^2). Para a análise multivariada, foi utilizada a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), com o objetivo de classificar os indivíduos nos grupos clínicos definidos (SC, BFC e AFC) com base nos dados hematológicos, de expressão gênica e atividade enzimática. Antes disso, aplicou-se a Análise de Componentes Principais (ACP), como ferramenta exploratória não supervisionada, para verificar a distribuição dos dados e possíveis outliers. A PLS-DA, por ser um método supervisionado, permitiu maximizar a separação entre os grupos. Para identificar as variáveis mais relevantes na classificação, utilizou-se o VIP score (*Variable Importance in Projection*), sendo consideradas importantes aquelas com valores acima de 1. As comparações dos níveis de expressão gênica e das atividades enzimáticas entre os grupos foram realizadas empregando-se a ANOVA para os dados paramétricos e o teste de Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos, com complementação pelo ajuste de Bonferroni. As correlações entre as variáveis foram analisadas por meio dos testes de correlação de Pearson, para dados paramétricos, ou de Spearman, para dados não paramétricos. As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando os softwares JASP, versão 0.19.3 (JASP Team, 2025), Statistica, versão 12 (StatSoft Inc., 2014), IBM SPSS Statistics, versão 25 (IBM Corp., 2017), GraphPad Prism, versão 9.0.0 (GraphPad Software, 2020), e MetaboAnalyst, versão 6.0 (www.metaboanalyst.ca). O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$) para todas as análises.

6. RESULTADOS

6.1. Análise de Expressão Gênica do *NFE2L2* e Genes Antioxidantes

A figura 5 apresenta os resultados da análise de expressão gênica do gene *NFE2L2* e dos genes antioxidantes. Para o gene *NFE2L2* (Figura 5A), não foram encontradas diferenças significativas na expressão gênica entre os grupos avaliados. Da mesma forma, o gene *CAT* (Figura 5B), também não apresentou diferenças significativas nos níveis de expressão entre os grupos estudados.

Quanto ao gene *SOD1* (Figura 5C), os dados mostraram diferenças estatisticamente significativas na expressão gênica entre os grupos avaliados. A análise *post hoc* identificou diferenças significativas entre o grupo SC e o grupo BFC (p= 0,002), assim como entre o grupo SC e o grupo AFC (p= 0,024). Por outro lado, não foi observada diferença significativa entre os grupos AFC e BFC.

O gene *TXNRD1* (Figura 5D) não apresentou diferenças estatisticamente significativas na expressão gênica entre os grupos analisados. De modo semelhante, os genes *GPX1* (Figura 5E) e *GRS* (Figura 5F) também não demonstraram diferenças significativas entre os grupos estudados.

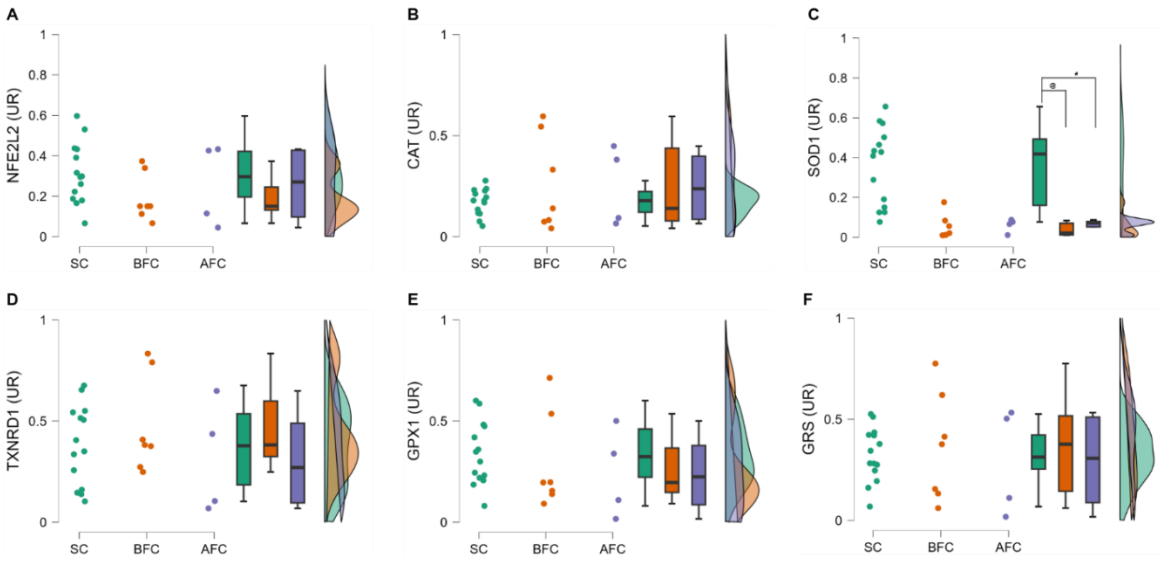


Figura 5. Expressão relativa de genes antioxidantes envolvidos na adaptação redox em reticulócitos. Os resultados foram analisados utilizando os testes de ANOVA e Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo (indicado pelos símbolos @ (p=0,002) e # (p=0,024)). (A) NRF2 (*NFE2L2*); (B) Catalase (*CAT*); (C) Superóxido dismutase 1 (*SOD1*); (D) Tioredoxina redutase 1 (*TXNRD1*); (E) Glutationa peroxidase 1 (*GPX1*); e (F) Glutationa redutase (*GRS*). Os grupos representados são: SC (sem crises), BFC (baixa frequência de crises) e AFC (alta frequência de crises).

6.2. Análise de atividade enzimática

Os resultados das atividades enzimáticas foram normalizados em relação à concentração de proteínas totais, quantificadas pelo método de Bradford. As comparações foram realizadas entre os grupos SC, BFC e AFC, conforme a adequação aos pressupostos dos testes estatísticos.

Em relação à atividade da Cat (Figura 6A), foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (p= 0,003). A análise *post hoc* identificou maior atividade enzimática no grupo AFC em comparação ao grupo BFC (p= 0,002). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos SC e BFC nem entre SC e AFC.

As atividades enzimáticas de GPx (Figura 6B), GR (Figura 6C), GST (Figura 6D) e G6PD (Figura 6E) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados.

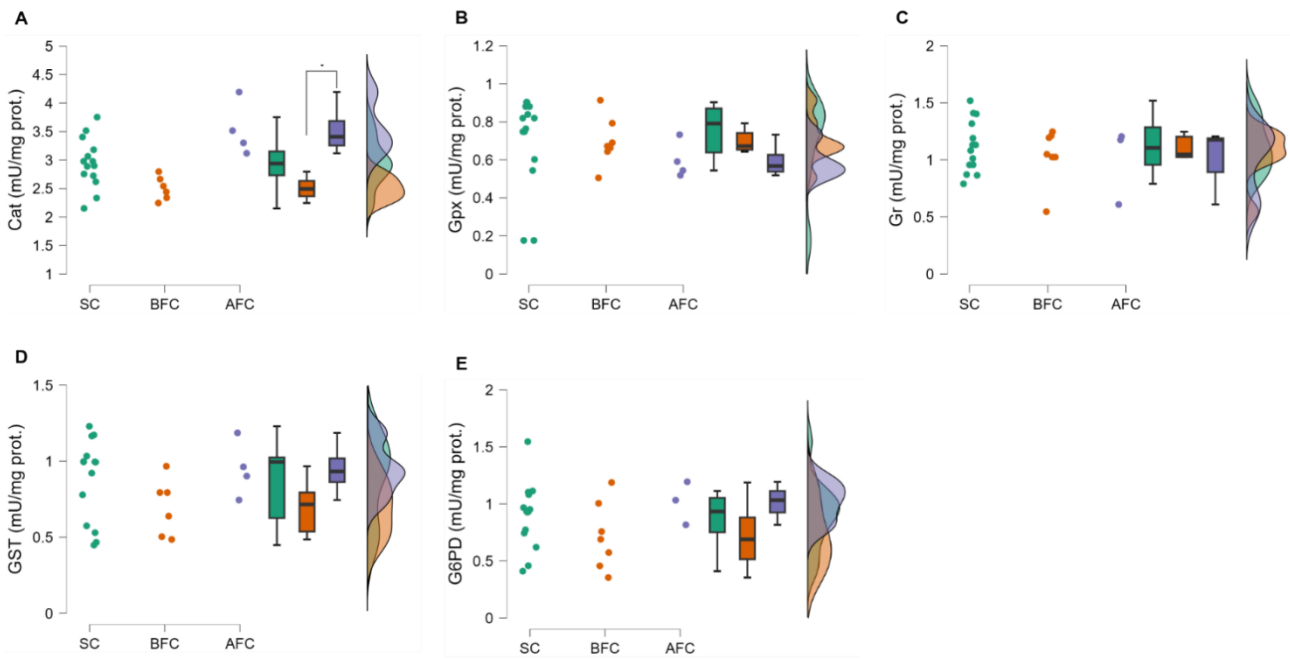


Figura 6. Atividade de enzimas antioxidantes envolvidas na adaptação redox. Níveis de atividade das enzimas antioxidantes catalase (Cat), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (Gr), glutationa S-transferase (GST) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) nos grupos sem crises (SC), com baixa frequência de crises (BFC) e com alta frequência de crises (AFC). Os valores foram expressos em unidades de atividade enzimática normalizadas por miligrama de proteína total (mU/mg prot.). As comparações entre os grupos foram realizadas por meio dos testes de ANOVA ou Kruskal-Wallis, conforme o atendimento aos pressupostos de normalidade e homocedasticidade, seguidos de

teste *post hoc* quando aplicável. Diferenças estatisticamente significativas foram indicadas por * (p< 0,05).

Com o objetivo de investigar a capacidade discriminatória das variáveis hematológicas, de expressão gênica e atividade enzimática combinadas entre os grupos, foi realizada uma análise multivariada por *Partial Least Squares - Discriminant Analysis* (PLS-DA). A Figura 7 apresenta o *score plot* e o *VIP score* resultantes dessa análise.

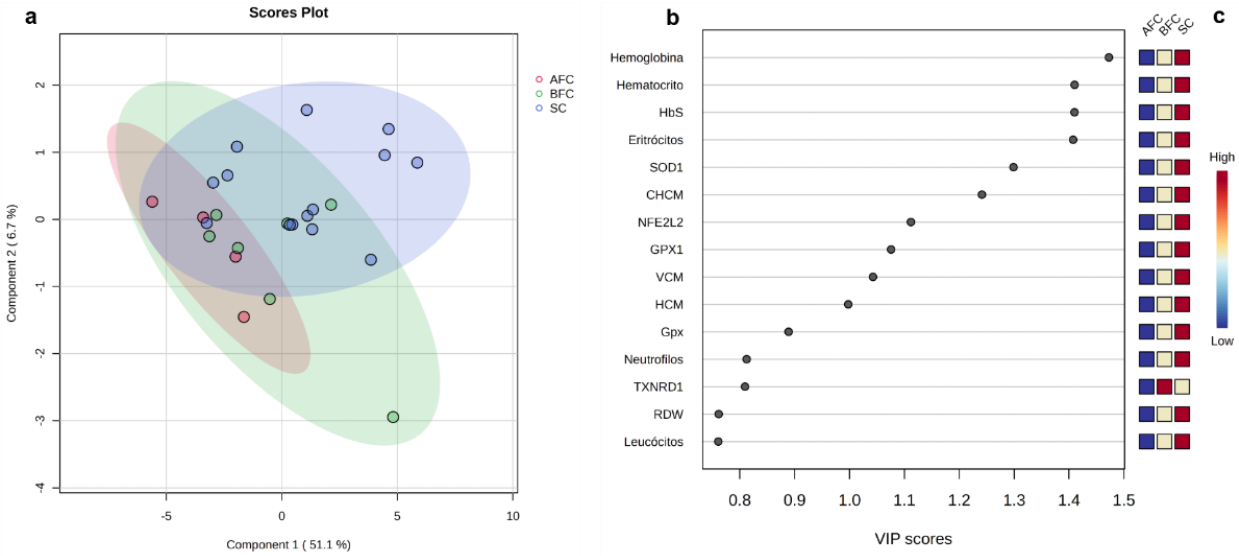


Figura 7. Gráfico de pontuação da PLS-DA dos dois primeiros componentes principais. (a) As áreas elípticas sombreadas indicam regiões com 95% de confiança. Os pontos verdes representam pacientes com baixa frequência de crises (BFC); os vermelhos, pacientes com alta frequência de crises (AFC); e os azuis, participantes sem crises (SC). **(b)** O *VIP* score classificou as características mais importantes para a discriminação entre os grupos. No eixo y, à esquerda da imagem, estão apresentadas todas as variáveis estudadas: genes — glutationa peroxidase 1 (*GPX1*), tioredoxina redutase 1 (*TXNRD1*), fator 2 relacionado ao NF-E2 p45 (*NFE2L2*) e superóxido dismutase 1 (*SOD1*); variáveis hematológicas — hemoglobina, hematócrito, hemoglobina S (HbS), eritrócitos, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), neutrófilos, leucócitos e *red cell distribution width* (RDW); e variável enzimática — atividade da glutationa peroxidase (Gpx). (c) O mini *heatmap* à direita representa as variações de concentração das variáveis dentro dos grupos. Fonte: MetaboAnalyst.

A análise avaliou a distribuição dos grupos com base nos níveis de expressão dos genes e nos valores hematológicos obtidos neste estudo. O Componente 1 explicou 51,1% da variância entre os grupos, representando a maior parcela da discriminação, enquanto o Componente 2 explicou 6,7% da variância. Observou-se uma sobreposição nas áreas de sombreamento entre os grupos SC, BFC e AFC, indicando que as características analisadas não foram suficientemente distintas para permitir uma separação clara entre os grupos (Figura 7a).

Na análise dos *VIP scores* (*Variable Importance in Projection*), a hemoglobina foi identificada como a variável mais relevante para a discriminação entre os grupos, com um *VIP* score de aproximadamente 1,5, seguida por hematócrito, Hb S, contagem de eritrócitos, *SOD1*, CHCM, *NFE2L2*, *GPX1*, VCM e HCM, todos com VIP scores superiores a 1,0. As variáveis RDW e leucócitos apresentaram VIP scores em torno de 0,8, indicando menor influência no modelo (Figura 7b).

Considerando a distribuição relativa das variáveis entre os grupos, o mini *heatmap* (Gráfico 3.c) revelou que a hemoglobina — variável de maior importância discriminatória — apresentou maior concentração no grupo SC, com tendência de diminuição nos grupos BFC e AFC. Esse padrão de distribuição foi semelhante para as demais variáveis analisadas, exceto o gene *TXNRD1.*

6.3. Análise de correlações

A integração entre mecanismos transcricionais (*NFE2L2, CAT, SOD1, TXNRD1, GPX1 e GRS*) e a atividade de enzimas antioxidantes (Cat, Gpx, Gr, GST e G6PD) é fundamental para a compreensão da influência gênica na regulação da resposta antioxidante, especialmente em contextos de diferentes frequências de crises.

Inicialmente, realizaram-se correlações entre *NFE2L2* e os genes antioxidantes *SOD1, TXNRD1, GPX1* e *GRS* (Figura 8). Posteriormente, foram conduzidas correlações entre os genes e suas respectivas enzimas antioxidantes (CAT-Cat; GPX1-Gpx; GRS-Gr), além de variáveis hematológicas (HbS e HbF) e a atividade das enzimas (Cat, Gpx, Gr, GST e G6PD). Os resultados dessas análises estão disponíveis no apêndice 6.

Foi realizada a correlação entre *NFE2L2* e os genes antioxidantes *SOD1, TXNRD1, GPX1 e GRS*. Observou-se uma correlação positiva e forte entre *NFE2L2* e *SOD1* ($\rho = 0{,}680$; $p < 0{,}001$) (Figura 8A). A correlação entre *NFE2L2* e *TXNRD1* foi positiva e moderada ($r = 0{,}507$; $p = 0{,}010$) (Figura 8B). Entre *NFE2L2* e *GPX1*, também foi identificada uma correlação positiva e moderada ($r = 0{,}591$; $p = 0{,}002$) (Figura 8C). Já a correlação entre *NFE2L2* e *GRS* foi positiva e forte ($r = 0{,}722$; $p < 0{,}001$) (Figura 8D).

As demais análises de correlação, que não demonstraram significância estatística, mas complementam a interpretação dos dados, encontram-se disponíveis para consulta no apêndice 6 — tabela S1, com a descrição dos coeficientes de correlação e respectivos valores de significância.

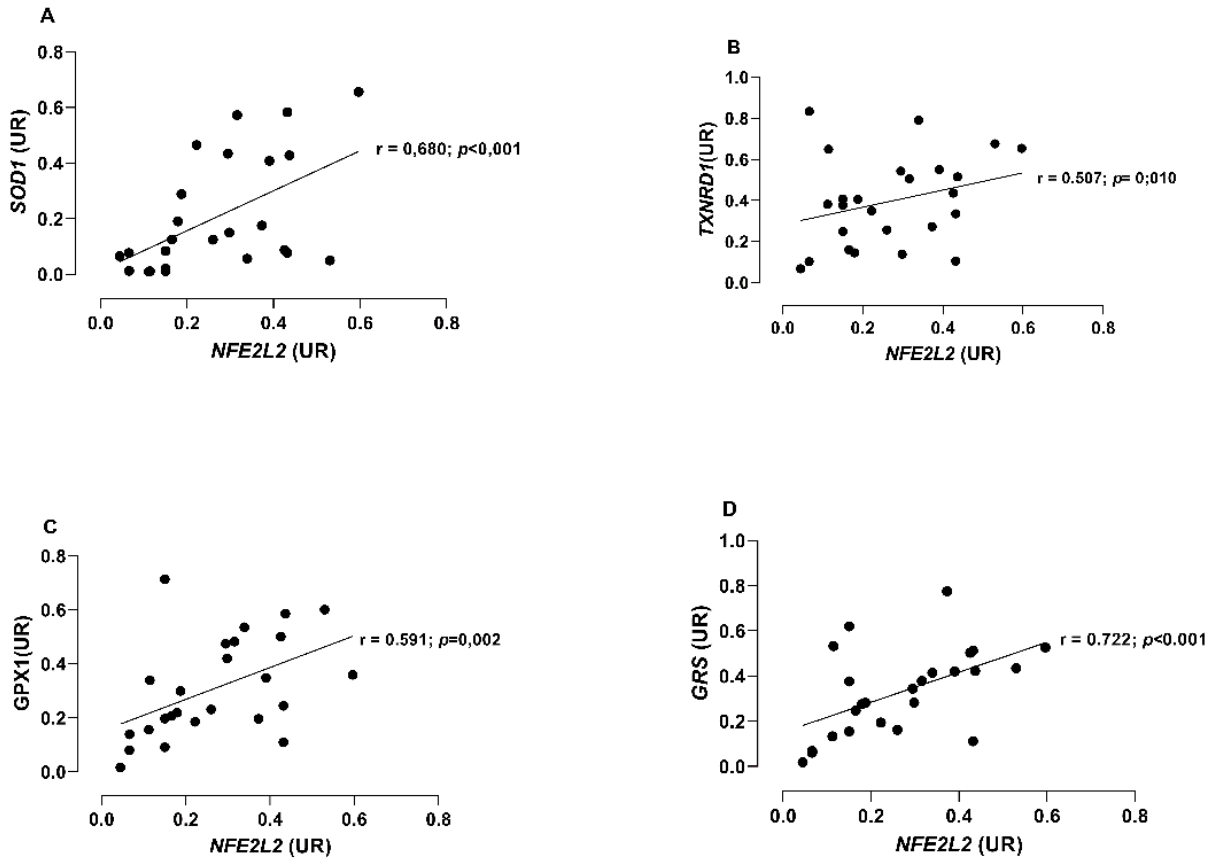


Figura 8. Correlações entre os níveis de expressão gênica de *NFE2L2* e enzimas antioxidantes. Correlações entre *NFE2L2* e o gene da superóxido dismutase 1 (*SOD1*, (A)), tiorredoxina redutase 1 (*TXNRD1*, (B)), glutationa peroxidase 1 (*GPX1*, (C)) e glutationa redutase (*GRS*, (D). Os coeficientes de correlação de Pearson ou Spearman foram utilizados conforme a distribuição dos dados. UR: unidade relativa de expressão gênica. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

7. DISCUSSÃO

O estresse oxidativo é amplamente reconhecido como um elemento central na fisiopatologia da AF, contribuindo de maneira significativa para a hemólise, a disfunção endotelial e os eventos vaso-oclusivos característicos da doença (Aboderin *et al*., 2023; Fibach; Rachmilewitz, 2008). Com base nesse entendimento, a presente investigação partiu da hipótese de que indivíduos com maior frequência de CVO apresentariam um perfil de estresse oxidativo mais exacerbado. Entretanto, os resultados obtidos não corroboraram essa expectativa: os genes antioxidantes avaliados não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, com exceção do gene *SOD1*. A ausência de diferenças na expressão gênica e na atividade enzimática para a maior parte dos genes avaliados concorda com revisões recentes que apontam que o ambiente redox desregulado constitui uma condição basal da anemia falciforme, não necessariamente relacionada à gravidade clínica da doença (Vona *et al*., 2021).

Os dados de idade, gênero e hematológicos dos grupos analisados não revelaram diferenças estatisticamente significativas. No entanto, observou-se uma tendência à redução dos níveis de hemoglobina e hematócrito nos grupos com maior frequência de CVO, o que está alinhado com o comportamento hematológico esperado para pacientes com maior gravidade clínica da DF. De forma semelhante, Tumburu *et al.,* (2021), ao investigarem o DNA mitocondrial de hemácias como um DAMP pró-inflamatório em indivíduos com DF em estado estacionário e durante CVO, também não identificaram diferenças estatisticamente significativas nos dados hematológicos entre os indivíduos.

Apesar disso, assim como no presente estudo, os autores relataram valores inferiores de hemoglobina, hematócrito e contagem de eritrócitos nos indivíduos com maior frequência de crises. Esses achados reforçam a hipótese de que a ausência de diferenças estatísticas possa estar relacionada à elevada heterogeneidade clínica da anemia falciforme. Conforme destacado por Belini-Junior *et al*; (2015), essa condição é caracterizada por ampla variabilidade entre os pacientes, abrangendo desde manifestações clínicas brandas até quadros graves, frequentemente associados a múltiplas comorbidades.

A análise multivariada dos dados por PLS-DA corrobora os achados da caracterização inicial dos grupos, uma vez que não evidenciou uma separação clara entre as condições clínicas avaliadas. Conforme ilustrado no *score plot* (Figura 7A), observa-se ampla sobreposição das elipses de confiança entre os grupos SC, BFC e AFC, indicando que os perfis individuais de variáveis hematológicas e de expressão gênica não seguem um padrão distintivo que permita segregação robusta entre os grupos. Tal distribuição reforça a heterogeneidade fenotípica inerente à população com AF e outros marcadores são encorajados a serem investigados.

O gene *SOD1* foi o único a apresentar diferença significativa de expressão entre os grupos SC, BFC e AFC, com maior expressão observada no grupo SC. A enzima superóxido dismutase (Sod1), codificada por esse gene, catalisa a dismutação do radical superóxido ($O_2\bullet^-$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), atuando como a primeira linha de defesa enzimática contra EROs no citosol (Eleutherio *et al*., 2021). Esperava-se que, em contextos de maior estresse oxidativo — como nos pacientes com maior frequência de CVO — a expressão de *SOD1* estivesse aumentada como parte de uma resposta adaptativa. No entanto, os achados do presente estudo foram contrários a essa hipótese: a expressão de *SOD1* mostrou-se reduzida nos grupos com maior frequência de crises.

Uma possível explicação para esse padrão é a demanda elevada por *SOD1* em eritrócitos imaturos sob condições de estresse oxidativo persistente, como observado em pacientes com crises frequentes. Nesses contextos, o mRNA de *SOD1* pode ser rapidamente recrutado para tradução e, em seguida, degradado, resultando em menores níveis transcritos detectáveis no momento da coleta.

De maneira semelhante, observou-se padrão de diminuição na expressão do gene *GPX1*, com menores valores para os grupos com maior frequência de crises. Contudo, para essa variável, não houve diferença estatística entre os grupos, apenas tendência observada. Para os demais genes analisados, hipotetiza-se que sua expressão esteja cronicamente elevada em todos os pacientes com AF, refletindo uma resposta adaptativa saturada. Esse achado está em conformidade com revisões recentes que apontam o ambiente redox desregulado como condição basal da doença, independentemente da gravidade clínica (Vona et al., 2021). Além disso, a

via KEAP1-NRF2, responsável pela ativação transcricional de diversos genes antioxidantes, apresenta regulação complexa, envolvendo mecanismos epigenéticos, retroalimentação negativa e controle pós-transcricional. (Yamamoto; Kensler; Motohashi, 2018)

A enzima catalase apresentou diferença estatística significativa entre os grupos BFC e AFC, com aumento da atividade enzimática em momentos de maior frequência de crises. A catalase é uma enzima-chave na manutenção do equilíbrio redox em pacientes com AF, catalisando a decomposição do H_2O_2 em água e oxigênio molecular. Esse processo é crucial para evitar a formação de espécies reativas mais tóxicas, como o radical hidroxila (•OH), gerado via reação de Fenton na presença de íons metálicos livres (Voskou *et al*., 2015b). Dessa forma, esse aumento parece representar uma resposta adaptativa a níveis mais intensos de ERO em pacientes com crises recorrentes. No entanto, a ausência de diferença significativa entre os grupos SC e AFC sugere que essa ativação não ocorre de maneira linear ou progressiva, podendo refletir mecanismos compensatórios ativados apenas em condições mais extremas de desequilíbrio redox.

A enzima GPx também apresentou padrão de diminuição em sua atividade conforme o aumento no número de crises, mas sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Esse resultado reflete o mesmo padrão observado nos níveis de expressão gênica — também sem significância estatística — com menor expressão no grupo AFC. Esses achados corroboram o estudo de Shanan; Thuwaini; Khudhair (2024), que investigou o papel do estresse oxidativo na AF e no traço falcêmico, destacando desequilíbrios entre enzimas antioxidantes e o aumento do risco cardiovascular. Nesse estudo, a atividade da GPx foi reduzida em comparação com pessoas saudáveis, demonstrando que o sistema de defesa contra peróxidos encontra-se mais comprometido em indivíduos com AF. Assim, com o maior número de crises, observa-se tendência de maior comprometimento da resposta enzimática da GPx.

As demais enzimas avaliadas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. A enzima Gr desempenha papel central na regeneração da GSH e, consequentemente, na homeostase redox, reforçando as defesas antioxidantes

celulares (Voskou *et al*; 2015). Entretanto, não foi observado padrão claro em relação ao número de crises. A expressão do gene *GRS* também se manteve semelhante à atividade da enzima, sugerindo que, apesar de seu papel crucial para o equilíbrio redox, a Gr atua em um regime funcional basal relativamente constante, com baixa sensibilidade à indução transcricional diante do estresse oxidativo exacerbado. Essa hipótese é reforçada pelos resultados da correlação entre *GRS* e Gr, que foi positiva, fraca e não significativa (p = 0,156). Por outro lado, ao analisarmos a correlação entre *GRS* e *NFE2L2*, observamos correlação positiva forte e significativa. Dessa forma, apesar da influência da via Nrf2, *GRS* e *Gr* aparentam operar sob um perfil de saturação funcional frente ao estresse oxidativo crônico da doença.

O estudo de Pavitra *et al*. (2024) reforça a ideia de que, embora haja uma indução parcial das enzimas antioxidantes em pacientes com AF, a demanda oxidativa crônica frequentemente ultrapassa a capacidade do sistema antioxidante, resultando em insuficiência na regeneração da GSH. Essa limitação impacta diretamente a funcionalidade de enzimas dependentes da GSH, como a GPx e a Gr. De fato, pacientes com doença falciforme tendem a apresentar níveis mais baixos de GSH e GPx, o que compromete a defesa antioxidante celular. Em consonância, o estudo de Hierso *et al.* (2017) demonstrou que, durante CVO, há uma redução significativa nos níveis de GSH nos eritrócitos, evidenciando o aumento do estresse oxidativo. A diminuição da GSH implica uma menor disponibilidade de substrato para a GPx, o que provavelmente prejudica sua eficiência na neutralização das espécies reativas de oxigênio, agravando ainda mais o desequilíbrio redox durante a crise.

De forma semelhante, as enzimas GST — responsável pela conjugação de GSH a compostos oxidativos tóxicos — e G6PD, fundamental na geração de NADPH essencial para a regeneração de GSH pela glutationa redutase (Voskou *et al*., 2015b), apresentaram padrões semelhantes: funcionamento basal e tendência à saturação, com baixa modulação frente à gravidade clínica, demonstrando limitação de sua atividade diante do aumento das crises.

Observamos correlações significativas entre níveis residuais de expressão de *NFE2L2* e de *SOD1*, *TXNRD1*, *GPX1* e *GRS* em reticulócitos, em consonância com o papel reconhecido de NRF2 na regulação de genes antioxidantes (Suzuki &

Yamamoto, 2015; Yamamoto, Kensler & Motohashi, 2018). Esses achados sugerem que a via NRF2-ARE contribui para moldar o perfil antioxidante no contexto eritropoiético da AF, alinhando-se às revisões que destacam o estresse oxidativo crônico e sua variabilidade clínica nessa doença (Vona *et al*; 2021; Pavitra, Acharya & Gupta *et al*., 2024). Assim, reforça-se a relevância de aprofundar investigações que considerem proteína NRF2, sua ativação em células nucleadas e respostas a desafios redox *ex vivo*, de modo a elucidar a dinâmica dessa via em diferentes condições clínicas e subsidiar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas voltadas à modulação redox.

Nesse contexto, torna-se pertinente considerar que marcadores inflamatórios poderiam ter maior poder discriminativo para estratificar indivíduos com diferentes perfis clínicos de AF, como as crises de dor. Estudos recentes indicam que genes como *TNF, CCL2 e ICAM1* estão fortemente associados à frequência e severidade das crises dolorosas (Katunaric, 2025). Além disso, Albo *et al;* (2020) identificaram biomarcadores plasmáticos de dor crônica com alta sensibilidade em pacientes com AF.

Uma limitação importante deste estudo reside na escolha dos reticulócitos como modelo celular para análise da expressão gênica. Embora essas células representem uma fase jovem e funcionalmente ativa da linhagem eritrocitária, elas podem não refletir com precisão o panorama inflamatório ou o estado redox sistêmico, uma vez que processos como VO e ativação imunológica envolvem múltiplos tipos celulares e componentes plasmáticos. Outra limitação foi o tamanho amostral relativamente reduzido (n = 25), distribuído em três grupos clínicos distintos: SC (n = 14), BFC (n = 7) e AFC (n = 4). Essa distribuição assimétrica e numericamente limitada compromete a robustez estatística das comparações e limita a generalização dos achados à população mais ampla de pacientes com AF. Apesar disso, os resultados obtidos fornecem indícios relevantes sobre a modulação da via antioxidante e suas implicações clínicas, mas estudos com amostras maiores e mais representativas são necessários para validar esses achados e explorar com maior poder estatístico as associações observadas.

Apesar dessas limitações, os achados deste estudo são relevantes e abrem caminho para investigações futuras mais abrangentes. A via Nrf2 segue como um alvo promissor, não apenas para estudos mecanísticos, mas também para abordagens terapêuticas. Ensaios pré-clínicos utilizando ativadores de Nrf2, como o CDDO-Me (Ihunnah *et al;* 2022) e o sulforafano (Doss *et al*; 2016), demonstram que a modulação dessa via pode reduzir inflamação e dano tecidual, mesmo sem impacto direto sobre a hemólise.

Portanto, a ausência de diferenças significativas nos biomarcadores redox, longe de diminuir a relevância do estudo, reforça a complexidade da AF e destaca a necessidade de modelos analíticos e experimentais mais integrativos. Estudos futuros devem considerar a combinação de marcadores redox e inflamatórios, a inclusão de outros tipos celulares — como leucócitos e células endoteliais — e abordagens longitudinais que permitam compreender a dinâmica da ativação dessas vias ao longo do curso clínico da doença.

8. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que a via NRF2-ARE não apresentou ativação diferencial em pacientes com AF em função da frequência de CVO. A expressão dos genes antioxidantes (*NFE2L2, CAT, GPX1, GSR, TXNRD1*) e as respectivas atividades enzimáticas mostraram-se estabilizadas, sem incremento proporcional ao aumento do número de crises, sugerindo um possível limite funcional no eixo antioxidante eritrocitário.

Esses achados sustentam a ideia de que, embora o sistema antioxidante endógeno permaneça relativamente constante entre os grupos, a redução específica da expressão de *SOD1* em pacientes com maior frequência de crises pode refletir uma adaptação saturada frente ao estresse oxidativo exacerbado.

Além disso, os achados reforçam que o modelo celular utilizado (reticulócito) pode não refletir integralmente as adaptações redox que ocorrem em tecidos com alta atividade metabólica ou em células imunes, o que limita a extrapolação direta dos dados para mecanismos sistêmicos.

Com base nos resultados, destaca-se o potencial do sistema inflamatório como alvo de investigação para identificação de moduladores clínicos da frequência de crises. Marcadores imunoinflamatórios podem revelar-se mais sensíveis na distinção entre diferentes perfis de gravidade.

Assim, este estudo contribui para a compreensão dos mecanismos redox na AF, especialmente em relação à frequência de crises, e abre perspectivas para novas abordagens investigativas, incluindo outros tipos celulares e vias moleculares complementares que melhor elucidem a fisiopatologia da doença.

REFERÊNCIAS

ABODERIN, Florence Ifechukwude *et al*. A review of the relationship between the immune response, inflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of sickle cell anaemia. **Biomedicines**, v. 11, n. 9, p. 2413, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.3390/biomedicines11092413.

AKRAM, Muhammad *et al.* Hexose monophosphate shunt, the role of its metabolites and associated disorders: a review. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 9, p. 14647–14658, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1002/jcp.28228.

ALBO, Camila *et al***.** Characteristics and potential biomarkers of adult sickle cell patients with chronic pain. **European Journal of Haematology**, v. 105, n. 4, p. 419–425, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1111/ejh.13461.

AL-SALEM, Ahmed H**.** Splenic complications of sickle cell anemia and the role of splenectomy. **ISRN Hematology**, v. 2011, p. 1–7, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.5402/2011/864257.

ALABDULSALAM, M. A**.** *et al***.** Impacts of oxidative stress and anti-oxidants on the development, pathogenesis, and therapy of sickle cell disease. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 31, n. 2, p. 103805, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103805 .

BAIRD, Liam; DINKOVA-KOSTOVA, Albena T**.** The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 20, p. 3859–3883, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10238-014-0293-6.

BALLAS, Samir K.; DARBARI, Deepika S. Review/overview of pain in sickle cell disease. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 51, p. 102327, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102327.

BELINI JUNIOR, Edis *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. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.01.011.

BEN KHALED, Monia ***et al*****.** Prevalence and predictive factors of splenic sequestration crisis among 423 pediatric patients with sickle cell disease in Tunisia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 80, p. 102374, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2019.102374.

BERNARDO, Victoria Simões *et al***.** Disrupted homeostasis in sickle cells: expanding the comprehension of metabolism adaptation and related therapeutic strategies. **Tissue and Cell**, v. 87, p. 102717, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.tice.2024.102717.

BRANDOW, Amanda M. *et al.* American Society of Hematology 2020 guidelines for sickle cell disease: management of acute and chronic pain. **Blood Advances**, v. 4, n. 12, p. 2656–2701, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001851.

CANÇADO, Rodolfo Delfini *et al***.** Estimated mortality rates of individuals with sickle cell disease in Brazil: real-world evidence. **Blood Advances**, v. 7, n. 15, p. 3783–3792, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022008938.

DÉLICAT-LOEMBET, Lucrèce M. *et al.* Bacterial infection in the sickle cell population: development and enabling factors. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 859, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.3390/microorganisms11040859.

DI PIERRO, Donato *et al***.** Effects of oral administration of common antioxidant supplements on the energy metabolism of red blood cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 463, p. 101–113, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11010-019-03633-5.

DOSS, Jennifer F. *et al***.** Phase 1 study of a sulforaphane-containing broccoli sprout homogenate for sickle cell disease. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, e0152895, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152895.

ELEUTHERIO, Elis Cristina Araujo *et al*. SOD1, more than just an antioxidant. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 695, p. 108701, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108701.

FIBACH, Eitan; RACHMILEWITZ, Eliezer**.** The role of oxidative stress in hemolytic anemia. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 7, p. 609–619, 2008. Disponível em: https://doi.org/10.2174/156652408786241384.

FREIRE, Ariana *et al.* Sickle cell anemia screening in newborns and analysis of haplotypes in patients from Santiago Island, Cape Verde. **Anemia**, v. 2024, p. 1–8, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1155/2024/1687917.

GHUNNEY, William Kwesi *et al*. Most adults with severe HbSC disease are not treated with hydroxyurea. **Blood Advances**, v. 7, n. 13, p. 3312–3319, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022009049.

HAKAMI, Faisal *et al*. Overview of the association between pathophysiology, types, and management of sickle cell disease and stroke. **Cureus**, v. 15, n. 12, e50577, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.7759/cureus.50577.

HIERSO, R. *et al*. Exacerbation of oxidative stress during sickle vaso-occlusive crisis is associated with decreased anti-band 3 autoantibodies rate and increased red blood cell-derived microparticle level: a prospective study. **British Journal of Haematology**, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1111/bjh.14476

IHUNNAH, Chibueze A. *et al***.** Nrf2 activation with CDDO-methyl promotes beneficial and deleterious clinical effects in transgenic mice with sickle cell anemia. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 880834, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fphar.2022.880834.

JOMOVA, Klaudia; BAROS, Stanislav; VALKO, Marian. Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems. **Transition Metal Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 127–134, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11243-012-9583-6.

KANIAS, Tamir; ACKER, Jason P**.** Biopreservation of red blood cells – The struggle with hemoglobin oxidation. **FEBS Journal**, v. 277, n. 14, p. 3432–3438, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07472.x.

KATO, Gregory J. *et al.* Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 18010, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.10.

KIRKHAM, Justin K. *et al.* Genetic variation and sickle cell disease severity: a systematic review and meta-analysis. **JAMA Network Open**, v. 6, n. 10, e2337484, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.37484.

KOEHL, Jennifer L. *et al*. High risk and low prevalence diseases: Acute chest syndrome in sickle cell disease. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 62, p. 190–196, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ajem.2022.06.018.

KUHN, Viktoria *et al.* Red blood cell function and dysfunction: Redox regulation, nitric oxide metabolism, anemia. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 26, n. 13, p. 718–742, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1089/ars.2016.6954.

LANA MUCALO KATUNARIC *et al*. Molecular inflammatory expression profiles associated with the frequency of pain in individuals with sickle cell disease. **Blood Advances**, v. 8, n. 8, p. 1805–1816, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2024015085.

LI, Botong *et al.* Natural products targeting Nrf2/ARE signaling pathway in the treatment of inflammatory bowel disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 164, p. 114950, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114950.

LIU, Shengnan; PI, Jingbo; ZHANG, Qiang**.** Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway. **Redox Biology**, v. 54, p. 102389, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102389.

MOTOHASHI, Hozumi; YAMAMOTO, Masayuki. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. **Trends in Molecular Medicine**, v. 10, n. 11, p. 549–557, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.09.003.

NADER, Elie *et al.* Vasculopathy in sickle cell disease: From red blood cell sickling to vascular dysfunction. **Comprehensive Physiology**, v. 11, n. 2, p. 1785–1803, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1002/cphy.c200024.

NITURE, Suryakant K.; KHATRI, Raju; JAISWAL, Anil K. Regulation of Nrf2 – an update. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 36–44, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.008.

NOVELLI, Enrico M.; GLADWIN, Mark T**.** Crises in sickle cell disease. **Chest**, v. 149, n. 4, p. 1082–1093, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.chest.2015.12.016.

OBEAGU, Emmanuel Ifeanyi**.** Nitric oxide dysregulation and vaso-occlusive crisis in sickle cell anemia: a review. **Journal of Hematology and Clinical Research**, v. 7, n. 3, p. 1–6, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.31579/2639-4162/210.

PAVITRA, Eluri *et al.* Impacts of oxidative stress and anti-oxidants on the development, pathogenesis, and therapy of sickle cell disease: A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 176, p. 116849, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116849.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta**.** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040.

RAMADAS, Nirupama; SPARKENBAUGH, Erica M. The APC-EPCR-PAR1 axis in sickle cell disease. **Frontiers in Medicine**, v. 10, 1141020, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1141020.

SATO, Yasuhiko *et al*. Genetic ablation of Nrf2 exacerbates neuroinflammation in ocular autoimmunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, 11715, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.3390/ijms231911715.

SCHIEBER, Michael; CHANDEL, Navdeep S**.** ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453–R462, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034.

SCIRÈ, A. *et al*. Glutathionyl hemoglobin and its emerging role as a clinical biomarker of chronic oxidative stress**. Antioxidants,** v. 12, n. 11, p. 1976, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.3390/antiox12111976.

SILVA, Danilo Grunig Humberto *et al***.** Oxidative stress in sickle cell disease: an overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 1101–1111, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.181.

SILVA, Marisa; FAUSTINO, Paula**.** From stress to sick(le) and back again–Oxidative/antioxidant mechanisms, genetic modulation, and cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. **Antioxidants**, v. 12, n. 11, p. 1977, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.3390/antiox12111977.

STARLARD-DAVENPORT, Athena *et al*. Innovations in drug discovery for sickle cell disease targeting oxidative stress and NRF2 activation—A short review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 9, 4192, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.3390/ijms26094192.

SUNDD, Prithu; GLADWIN, Mark T.; NOVELLI, Enrico M**.** Pathophysiology of sickle cell disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, p. 263–292, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838.

SUZUKI, Takafumi; TAKAHASHI, Jun; YAMAMOTO, Masayuki**.** Molecular basis of the KEAP1-NRF2 signaling pathway. **Molecules and Cells**, v. 46, n. 6, p. 421–432, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.14348/molcells.2023.0028.

SUZUKI, Takafumi; YAMAMOTO, Masayuki. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 93–100, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006.

THOMSON, Azalea M. *et al.* Global, regional, and national prevalence and mortality burden of sickle cell disease, 2000–2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021. **The Lancet Haematology**, v. 10, n. 8, p. e585–e599, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S2352-3026(23)00118-7.

TUMBURU, Laxminath *et al***.** Circulating mitochondrial DNA is a proinflammatory DAMP in sickle cell disease. **Blood**, v. 136, n. 6, p. 804–815, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1182/blood.2020009063.

VAN ZWIETEN, Rob; VERHOEVEN, Arthur J.; ROOS, Dirk**.** Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 67, p. 377–386, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.022.

VONA, Rosa *et al*. Sickle cell disease: role of oxidative stress and antioxidant therapy. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, 296, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3390/antiox10020296.

VOSKOU, S. *et al*. Oxidative stress in β-thalassaemia and sickle cell disease. **Redox Biology**, v. 6, p. 226–239, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.018.

WARE, Russell E. *et al***.** Sickle cell disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10091, p. 311–323, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30193-9.

WILLIAMS, Thomas N.; THEIN, Swee Lay. Sickle cell anemia and its phenotypes. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 19, p. 113–147, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083117-021320.

YAMAMOTO, Masayuki; KENSLER, Thomas W.; MOTOHASHI, Hozumi**.** The KEAP1-NRF2 system: a thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1169–1203, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2017.

ANEXOS

Anexo 1. Comprovante de envio do projeto ao CEP da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e CAAE.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL - UFMS

Plataforma Brasil

COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O PAPEL DA VIA NRF2-ARE NA ADAPTAÇÃO REDOX CELULAR DURANTE CRISES OCLUSIVAS DE PESSOAS COM ANEMIA FALCIFORME

Pesquisador: EDIS BELINI JUNIOR

Versão: 2

CAAE: 77279623.2.0000.0021

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 008816/2024

Patrocionador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto O PAPEL DA VIA NRF2-ARE NA ADAPTAÇÃO REDOX CELULAR DURANTE CRISES OCLUSIVAS DE PESSOAS COM ANEMIA FALCIFORME que tem como pesquisador responsável EDIS BELINI JUNIOR, foi recebido para análise ética no CEP Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS em 05/02/2024 às 13:04.

Endereço: Av. Costa e Silva, s/nº - Pioneiros ¿ Prédio das Pró-Reitorias ¿Hércules Maymone¿ ¿ 1º andar
Bairro: Pioneiros **CEP:** 70.070-900
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br

APÊNDICE

Apêndice 1. Questionário de pesquisa clínico.

Nome completo:_____

Data:____/___/_____

Data de nascimento:____/____/_____ Idade do diagnóstico: _____

Data da última consulta: _____ Telefone para contato: _____

Diagnóstico (Hb SS/Sβ ou SC): _____

Histórico:

O paciente é fumante? ( ) sim ( ) não.

O paciente faz o uso de *Cannabis sativa* L. (maconha) nos últimos 15 dias ou de canabidiol nos últimos 30 dias? ( ) sim ( ) não

O paciente está gestante? ( )sim ( ) não

O paciente fez o uso de bebidas alcoólicas nas últimas 48 horas? ( )sim ( ) não

O paciente fez o uso de antibióticos nas últimas 48 horas? ( )sim ( ) não

O paciente fez o uso de ácido acetilsalicílico nas últimas 48 horas? ( )sim ( ) não

História Clínica: Complicações Agudas ou Crônicas

Nº de crises de dor por ano no último ano: ( ) 0 a 2 ( ) 3 a 5 ( ) maior ou igual a 6

Nº de infecções por ano no último ano: ( ) 0 a 2 ( ) 3 a 5 ( ) maior ou igual a 6

Nº de internações por ano no último ano: ( ) 0 a 2 ( ) 3 a 5 ( ) maior ou igual a 6

Manifestações	**Não**	**Sim**	**Data do evento**	**Recorrência (Quantas vezes)**
Colelitíase:				
Colecistectomia				
Esplenectomia				
AVC (Isquêmico/Hemorrágico)				
Úlcera Maleolar (UM):				
Osteonecrose				
Priapismo				
Síndrome Torácica Aguda				

Histórico Transfusional

-Nº de unidades de concentrado de hemácias transfundidas até o início do estudo?

( ) menor 10 ( ) 10 a 20 ( ) 21 a 30 ( ) 31 a 10 ( ) maior que 40.

- Em regime regular de transfusão de hemácias?

( ) Não ( ) Sim Intervalo:_____

Data da última transfusão:_____

Medicamentos em uso:

Medicamento	Uso		Início (data)	Dose diária
	Não	Sim		
Hidroxiureia				
Desferroxamina (Desferal):				
Deferiprona (Ferriprox)				
Deferasirox (Exjade)				
Ácido fólico				
Vitaminas				
Analgésicos				
Outros				

Dados bioquímicos e Hematológicos:

Marcadores	Valores
RBC	
Hemoglobina (g/dL)	
Hematócrito (%)	
VCM	
HCM	
CHCM	
RDW	
WBC	
Neutrófilos	
Linfócitos	
Monócito	
Eosinófilo	
Basófilo	
Plaquetas	
Reticulócitos	

LDH	
Bilirrubina Total	
Bilirrubina Indireta	
Bilirrubina Direta	
Creatinina	
Ureia	
TGO	
TGP	
Fosfatase alcalina	

Apêndice 2. Termo de consentimento livre e esclarecido aplicado para a coleta das amostras de sangue venoso dos pacientes participantes da pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezado(a) participante, você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa "O papel da via NRF2-ARE na adaptação redox celular durante crises oclusivas de pessoas com anemia falciforme" sob responsabilidade do pesquisador Édis Belini Junior.

O objetivo do estudo é investigar mecanismos genéticos (via NRF2-ARE) e sua importância na adaptação antioxidante nos indivíduos com anemia falciforme para a compreensão dos mecanismos genéticos e moleculares fisiopatológicos da doença falciforme.

Sua participação é voluntária, isto é, ela não é obrigatória, e você tem plena autonomia para decidir se quer ou não participar, bem como retirar sua participação a qualquer momento. Você não terá nenhum prejuízo caso decida não participar ou desistir do estudo. Você terá o tempo suficiente para decidir sobre sua participação e, caso necessário, pode consultar algum familiar ou outra pessoa que possa ajudá-lo na tomada de decisão.

Qualquer dado que possa identificá-lo será omitido na divulgação dos resultados da pesquisa e o material será armazenado em local seguro. Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade das suas informações e a qualquer momento, durante a pesquisa, ou posteriormente, você poderá solicitar do pesquisador informações sobre sua participação e/ou sobre a pesquisa, o que poderá ser feito através dos meios de contato explicitados neste Termo.

Caso aceite participar, serão coletadas uma amostras de sangue total, em tubo apropriado (EDTA - 5 mL), pelos profissionais de saúde do Hemocentro do Maranhão (HEMOMAR), em seguida as amostras serão enviadas para o Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UFMS/CPTL para a realização de testes laboratoriais, devidamente embaladas á temperaturas baixas para conservar a amostra.

O estudo não proporcionará qualquer tipo de despesa financeira para você nem mesmo proporcionará nenhum recurso financeiro para participar desta pesquisa. Se houver algum gasto exclusivamente para participar desta pesquisa, este gasto lhe será ressarcido. Você também terá direito a indenização no caso de qualquer dano que eventualmente aconteça e que for produzido pela pesquisa. Ao final da pesquisa, todo material será mantido em arquivo, sob guarda e responsabilidade do pesquisador responsável, por pelo menos 5 (cinco) anos, conforme Resolução CNS no 466/2012.

Os benefícios de sua participação nesta pesquisa são de caráter coletivo, em prol da compreensão de uma parte do mecanismo de ação da doença falciforme, a qual, posteriormente poderá gerar o desenvolvimento de novos tratamentos e ativos farmacológicos.

Os riscos de sua participação são decorrentes da possibilidade de mancha roxa no local da coleta de sangue, porém não será necessário de coleta adicional para exames posteriores. Caso haja surgimento de manchas roxas, procure o hemonúcleo ou uma Unidade Básica de Saúde próxima a sua residência para orientações. Outro

risco envolvido consiste na quebra de sigilo, mas todos os dados gerados neste estudo não serão relacionados com o seu nome, pois todas as amostras biológicas serão identificadas com códigos garantindo o anonimato. A possibilidade de constrangimento de não aceitar a participar do estudo será minimizada pelos esclarecimentos de todas as dúvidas que possam surgir por meio das explicações do pesquisador responsável pelo projeto.

_____ _____

Rubrica do pesquisador: Rubrica do participante

Você tem a liberdade de não participar do estudo e o acompanhamento de sua condição não sofrerá nenhuma interferência e seu atendimento no Hemocentro não será impedido, ou seja, todo acompanhamento clínico ou psicológico durante e após a pesquisa será mantido e você pode procurar o pesquisador para orientação, bem como procurar a Unidade Básica de Saúde e Hemocentro para assistência. Reitero que suas informações são confidenciais, mantendo, assim, seu anonimato e que você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e, então, retirar-se da pesquisa. Os resultados do estudo serão divulgados em eventos científicos, publicados em revistas científicas, dissertações e teses, resumos, pôsteres, manual técnico e relatórios.

Em caso de dúvidas quanto à sua participação, você pode entrar em contato com o pesquisador responsável pelo e-mail ‘’belini.junior@ufms.br’’, do telefone “(67) 3509-3743”, ou pelo endereço “UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campus de Três Lagoas/MS, Endereço: Av: Ranulpho Marques Leal, 3484 – Distrito Industrial, Unidade VIII, Três Lagoas – MS”.

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS (CEP/UFMS), localizado no Campus da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, prédio das Pró-Reitorias ‘Hércules Maymone’ – 1º andar, CEP: 79070900. Campo Grande – MS; e-mail: cepconep.propp@ufms.br; telefone: 67-3345-7187; atendimento ao público: 07:30-11:30 no período matutino e das 13:30 às 17:30 no período vespertino. O Comitê de Ética é a instância que tem por objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Dessa forma, o comitê tem o papel de avaliar e monitorar o andamento do projeto de modo que a pesquisa respeite os princípios éticos de proteção aos direitos humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade.

Esse termo é assinado em duas vias originais, sendo uma do(a) Sr.(a) e a outra para o pesquisador responsável pela pesquisa.

_____ _____

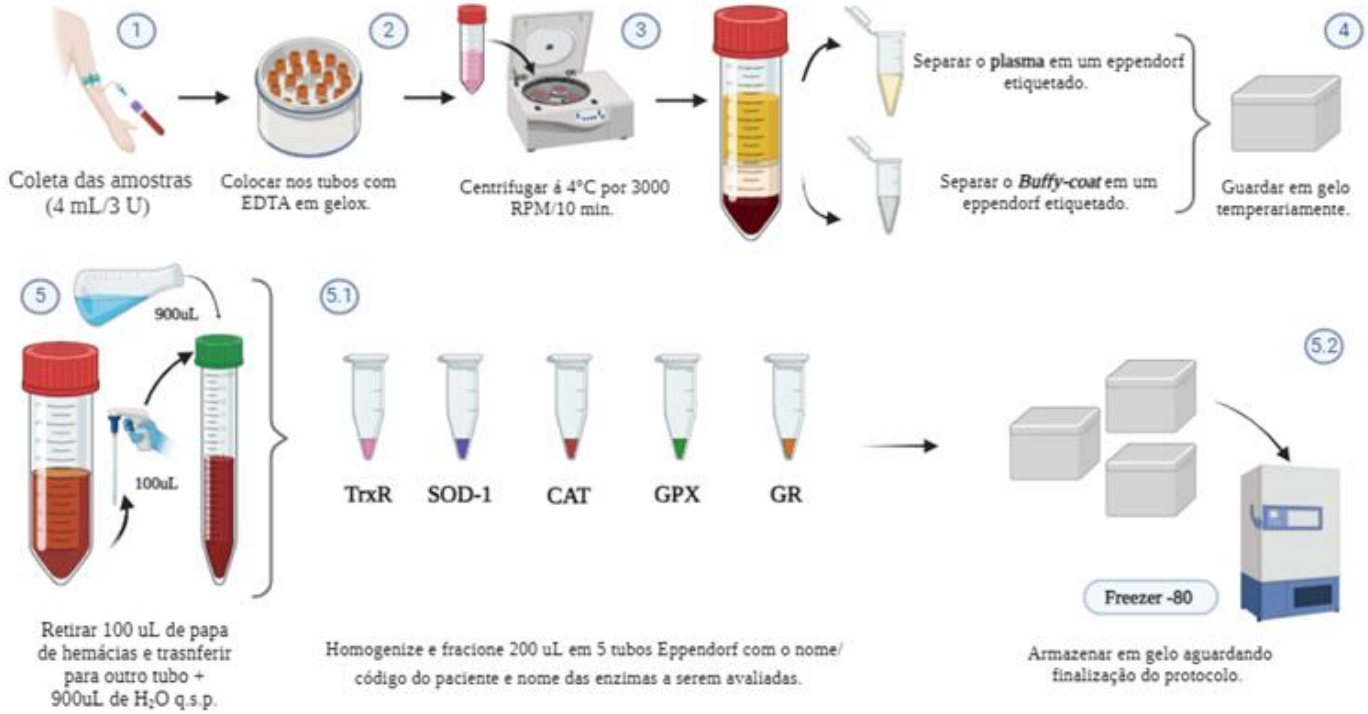
Nome do participante Local e data

_____	_____
Nome e assinatura do pesquisador	Local e data

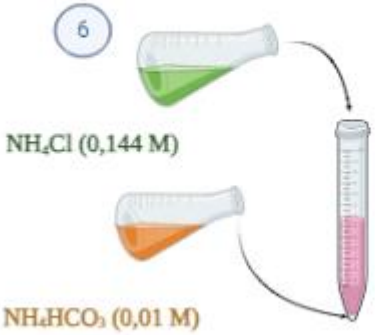
Apêndice 3. Protocolo de separação de reticulócitos a partir de sangue periférico.

Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM/UFMS

Protocolo para separação de reticulócitos a partir de sangue periférico (modificado a partir do protocolo do The New York Blood Center).



6



Adicionar **5 volumes** (em relação ao conteudo restante no tubo falcon) de solução NH_4Cl com 0,5 Volume de NH_4HCO_3.

7

Agitar vigarozamente.

7.1

Incubar em gelo por 30 minutos, agitando vigorozamente a cada 5 minutos.

8

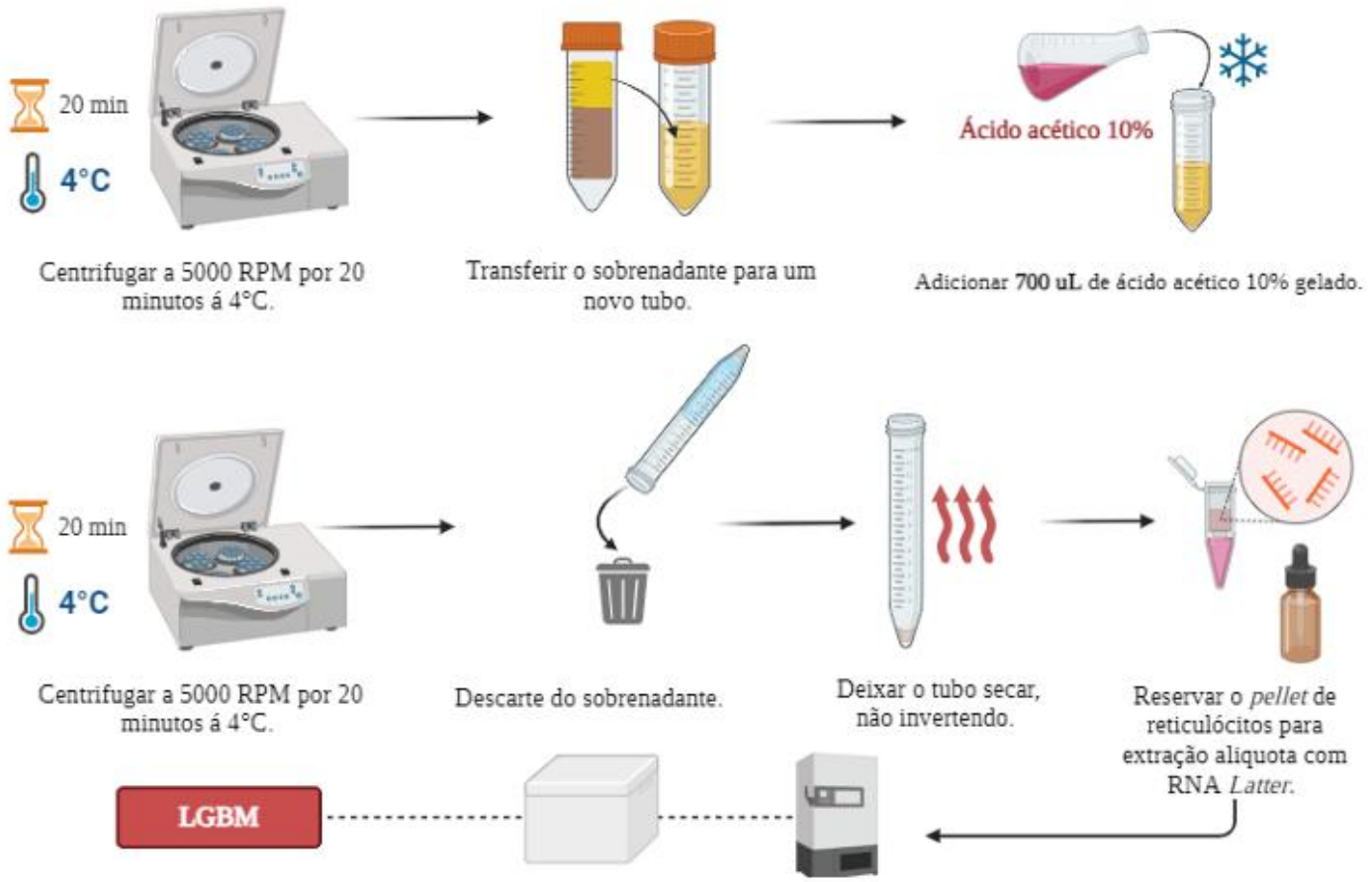
Centrifugar á 3000 RPM por 15 minutos á 4°C.

9

Transferir o sobrenadante para um novo tubo falcon.

10

Adicionar **1/10** de volume de sucrose (1,5 M) / KCl (0,15 M) ao sobrenadante e homogeneizar a solução.



Fonte: elaborado pelo autor utilizando a plataforma BioRender (https://app.biorender.com)

Apêndice 4. Gel de agarose para avaliação de integridade de RNA.

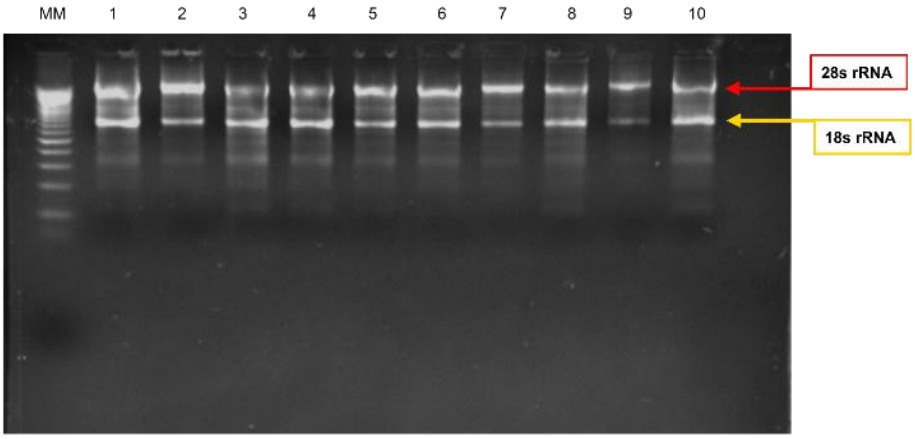
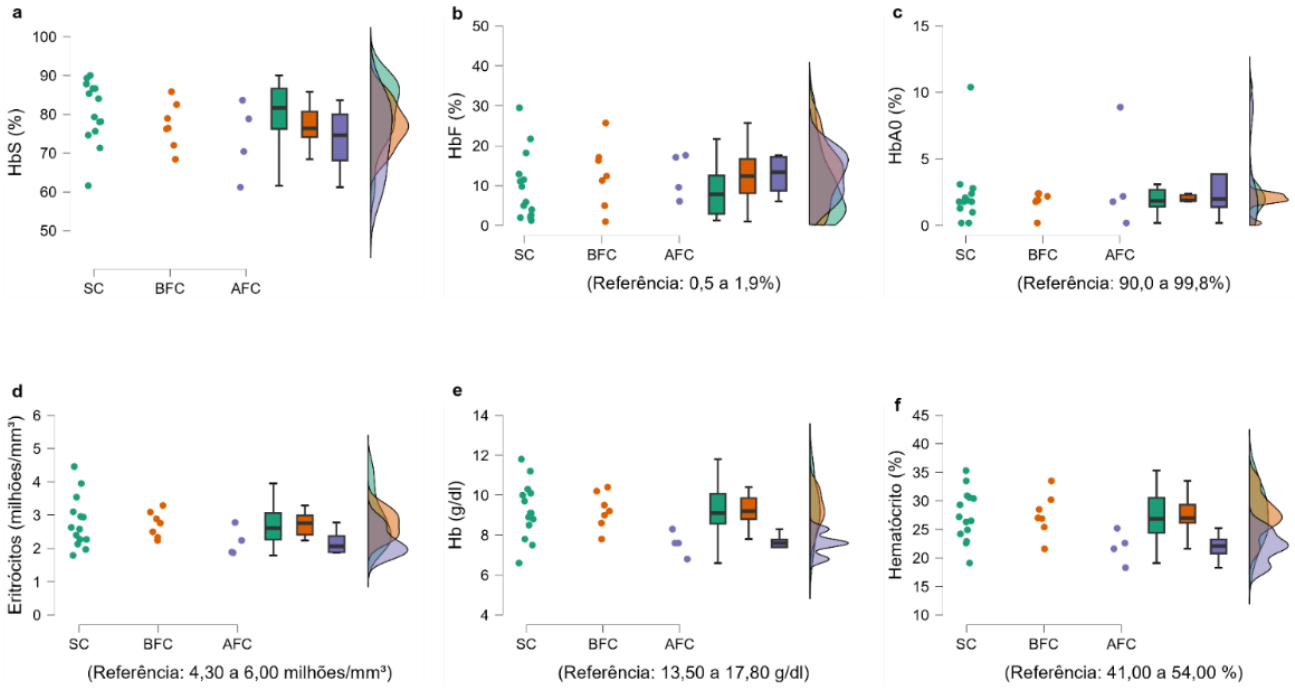


Figura 5. Análise de integridade do rRNA em pacientes com AF como preditor de qualidade para o RNAm. As amostras de 1 a 10 exibiram os padrões de bandas 28S e 18S do rRNA, com regiões bem definidas, sem arraste e com alta fluorescência, evidenciando a excelente integridade do RNA. Essa qualidade foi essencial para a amplificação de cDNA utilizado nas análises de qPCR. A análise foi realizada em gel de agarose a 2,0% por 20 minutos. **MM** = marcador molecular.

Apêndice 5. Boxplots de variáveis demográficas, genéticas e hematológicas na caracterização dos grupos de estudo.



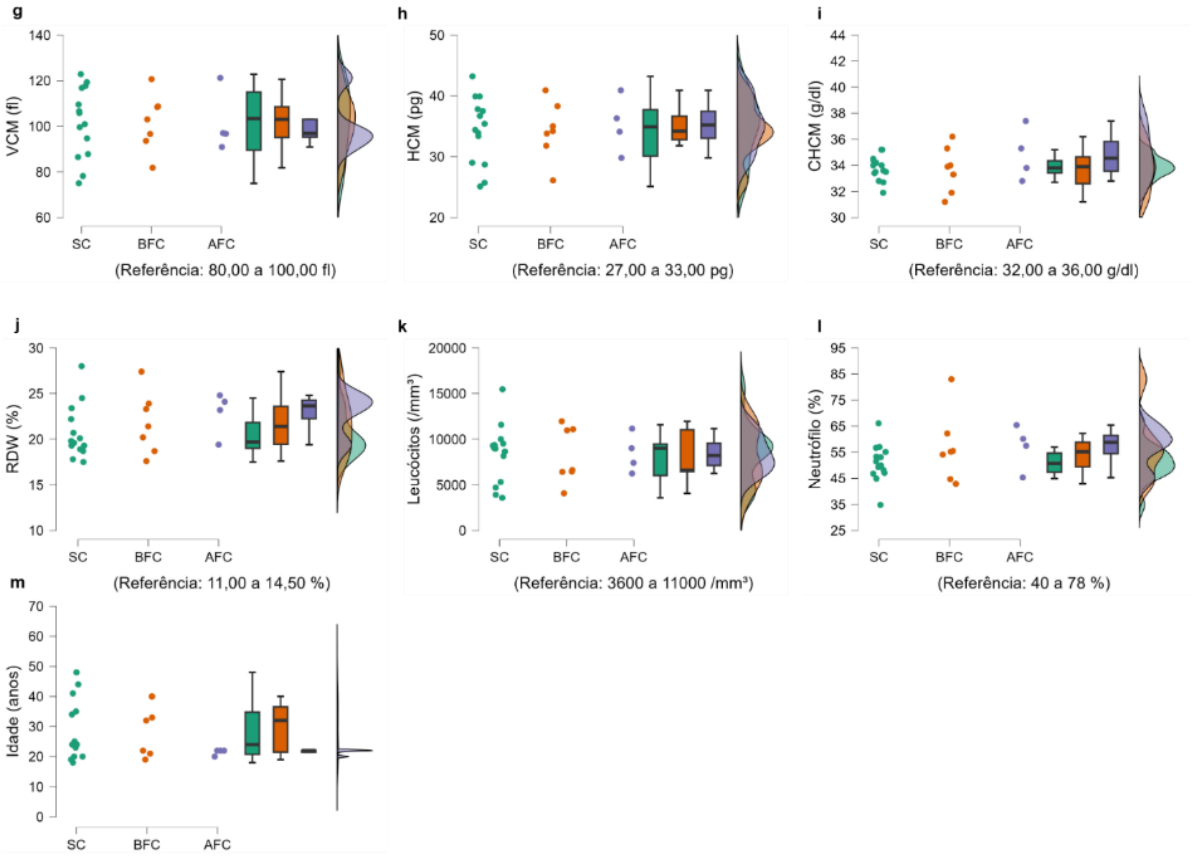


Gráfico 5. Parâmetros hematológicos e idade nos grupos SC, BFC e AFC. Comparação dos parâmetros hematológicos entre os grupos sem crise (SC), com baixa frequência de crises (BFC) e com alta frequência de crises (AFC). São apresentados os níveis de (a) hemoglobina S (HbS, %), (b) hemoglobina fetal (HbF, %), (c) hemoglobina normal (HbA0, %), (d) eritrócitos (milhões/mm³), (e) hemoglobina total (Hb, g/dL) e (f) hematócrito (%). (g) volume corpuscular médio (VCM, fl), (h) hemoglobina corpuscular média (HCM, pg), (i) concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM, g/dL), (j) amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW, %), (k) leucócitos (células/mm³), (l) neutrófilos (%), e (m) idade (anos). Os valores de referência para cada parâmetro são indicados abaixo dos gráficos. As comparações foram realizadas por ANOVA ou Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. A distribuição dos dados é ilustrada por *boxplots* e gráficos de densidade.

Apêndice 6. Análises de correlação.

Tabela S1. Coeficientes de correlação entre genes antioxidantes, atividades enzimáticas e variáveis hematológicas que não apresentaram significância estatística.

Variáveis correlacionadas	Coeficiente de Correlação (r)	Valor de *p*
*NFE2L2-CAT***	0,091	0,665
CAT-Cat**	-0,105	0,626
GPX1-GPx**	0,110	0,600
GRS-Gr*	0,299	0,156
HbS-Cat*	0,207	0,332
HbF-Cat*	-0,200	0,350
HbS- GPx**	0,168	0,422
HbF-GPx**	0,081	0,701
HbF-Gr*	-0,384	0,064
HbS- GST*	0,351	0,092
HbF-GST*	-0,311	0,140
HbS- G6PD*	-0,157	0,464
HbF-G6PD*	0,248	0,244

Testes de correlação de Pearson (indicado por *) e Spearman (indicado por **) realizados conforme a normalidade dos dados. Resultados considerados não significativos ($p > 0,05$). Variáveis analisadas: expressão gênica (NFE2L2, *CAT, GPX1, GRS*), atividade enzimática (Cat, GPx, Gr. GST e G6PD) e níveis hematológicos (HbF, HbS). Coeficientes de correlação (r) e valores de *p* são apresentados. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliação da normalidade dos dados, orientando a escolha entre o teste de correlação de Pearson (dados normais) e o teste de Spearman (dados não normais). *NFE2L2*: gene do fator de transcrição Nrf2 *CAT*: gene da Catalase; *GPX1*: gene da glutationa peroxidase; *GRS*: gene da Glutationa redutase; Cat: enzima catalase; GPx: enzima glutationa peroxidase; Gr: enzima glutationa redutase; GST: enzima glutationa S-transferase; G6PD: enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase; HbS: Hemoglobina S; HbF: Hemoglobina Fetal.