



UFRJ
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO



instituto de
ciências farmacêuticas
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé

AGHATA VITORIA MACHADO

**DEHP MODULA A POLIMERIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA S DE PACIENTES
FALCIFORMES**

Macaé

2022



UFRJ
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO



instituto de
ciências farmacêuticas
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Macaé

AGHATA VITORIA MACHADO

**DEHP MODULA A POLIMERIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA S DE PACIENTES
FALCIFORMES**

Trabalho de conclusão de curso (TCC) apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé, como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Clemilson Berto Júnior

Coorientadora: Dra. Camila Cristina Guimarães Nobre

Macaé

2022

Verso da folha de rosto

CIP - Catalogação na Publicação

M149

Machado, Aghata Vitoria

DEHP modula a polimerização da hemoglobina S de pacientes falciformes /
Aghata Vitoria Machado - Macaé, 2022.

42 f.

Orientador(a): Clemilson Berto Júnior .

Coorientador(a): Camila Cristina Guimarães Nobre.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia, 2022.

1. Anemia falciforme. 2. Dietilexilftalato. 3. Hemoglobina.

I. Berto Júnior, Clemilson, orient. II. Nobre, Camila Cristina Guimarães, coorient.

III. Título.

CDD 615.39

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Biblioteca Central do Centro Multidisciplinar UFRJ-Macaé
Bibliotecário: Anderson dos Santos Guarino CRB7 – 5280

AGHATA VITORIA MACHADO

**DEHP MODULA A POLIMERIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA S DE PACIENTES
FALCIFORMES**

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para
obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 16 de dezembro de 2022.

Comissão avaliadora:

Prof. Dr. Clemilson Berto Junior (Presidente da Banca)

Professor Adjunto - UFRJ/Campus Macaé

<http://lattes.cnpq.br/7556214371220650>

Prof. Dr. Leonardo Paes Cinelli

Professor Associado - UFRJ/Campus Macaé

<http://lattes.cnpq.br/7785991878476659>

Prof. Dr.^a Karine da Silva Verdoorn

Professora Adjunta - UFRJ/Campus Macaé

<http://lattes.cnpq.br/0659726776097432>

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar minha vida e tornar possível a realização desse sonho.

A minha avó, Maria Santana, que não mede esforços para me ajudar, sempre incentivando e apoiando meus estudos em busca do melhor para a minha vida profissional. Obrigada por não desistir de mim e por todo investimento financeiro que me permite colocar esse sonho em prática.

Ao meu avô, João Luiz (em memória), que em vida esteve sempre ao meu lado apoiando meus estudos e me instruiu a chegar até aqui, onde a última coisa que me pediu foi para que eu nunca parasse de estudar.

A minha mãe, Elisabete Machado, que me apoiou a sair de casa para estudar em outra cidade, que me ensinou desde criança a não desistir dos meus sonhos mesmo que eles pareçam impossíveis, que sempre foi uma amiga deixando meus dias mais leves, além de todo apoio psicológico e financeiro.

Ao meu irmão, João Eduardo, por ser a companhia da minha família na minha ausência e que compreende meus esforços.

Ao meu padrasto, Elio Eduardo, por me apoiar desde o início quando entrar na universidade pública ainda era um sonho e por todo amparo.

Aos meus amigos da faculdade, em especial a Elyandra, por todo companheirismo, amizade e fidelidade desde o início que mesmo com muitas turbulências pelo caminho nunca me deixou sozinha, me mostrando que estamos juntas na UFRJ e na vida.

Aos meus amigos de infância, em especial a Dandara, Júlia Mello, Julya Candido e Mylena Sodré, que mesmo com a distância me acalmam, torcem por mim e apoiam meus caminhos, me ensinando o verdadeiro significado de amizade.

Ao meu namorado, que me incentiva, apoia e oferece todo o suporte psicológico necessário para enfrentar essa etapa, estando sempre ao meu lado.

Ao meu querido orientador, Prof^o. Dr^o Clemilson Berto Júnior, por me incluir em seu Grupo de Pesquisa em Fisiologia Eritróide, por todo aprendizado, paciência e esforços para a realização desse trabalho.

A minha querida coorientadora, Dr^a Camila Cristina Guimarães Nobre, por me ajudar na realização desse trabalho, por todo tempo investido, pela paciência e dedicação em corrigir meus erros e me ensinar novas perspectivas.

A todos que fazem parte do grupo de pesquisa em fisiologia eritróide por toda troca construtiva que auxiliou na produção desse trabalho.

Aos professores que aceitaram participar da banca de defesa, pelas sugestões e apontamentos que contribuirão para andamento da pesquisa.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a produção deste trabalho, meu muito obrigada.

RESUMO

A doença falciforme é ocasionada por uma mutação na posição 6 da beta globina, que codifica uma valina em vez do ácido glutâmico e provoca uma modificação estrutural na proteína que leva a formação da hemoglobina S (HbS). Quando desoxigenada, ocorre a polimerização da HbS que prejudica a oxigenação sanguínea e altera a morfologia do eritrócito do formato de disco bicôncavo para um de foice. Por causar muitas manifestações clínicas como as crises dolorosas, seu tratamento é feito, principalmente, com a hidroxauréia e em casos graves com transfusões sanguíneas constantes. As bolsas de sangue são feitas de policloreto de vinila (PVC) junto com a adição de plastificantes, sendo o DEHP (di(2-etil-hexil) ftalato), o mais utilizado, sendo classificado como interferente endócrino. Esses plastificantes, ao entrar em contato com o ser humano, podem provocar efeitos tóxicos que modificam o sistema endócrino causando distúrbios no metabolismo da glicose, disfunção tireoidiana, má formação congênita e outros. A fim de analisar como os plastificantes presentes nas bolsas de sangue interferem na qualidade do material armazenado, o objetivo desse trabalho visa avaliar se a hemoglobina (Hb) é capaz de interagir com o DEHP e se, dessa forma, modularia a polimerização da HbS dos eritrócitos de pacientes falciformes. Dessa maneira, foi realizado o teste de polimerização da HbS em eritrócitos falciformes utilizando quatro concentrações finais de DEHP, sendo elas: 25 μM ; 2,5 μM ; 250 nM e 25 nM. Os resultados significativos obtidos *in vitro* apresentaram que o DEHP interage diretamente com a Hb isolada do paciente falciforme sendo capaz de aumentar a polimerização da HbS na maior concentração analisada de 25 μM . Em contrapartida, ao analisar menores concentrações de DEHP, como as de 2,5 μM e 25 nM, este demonstrou que atua retardando o início polimerização. Depreende-se, portanto, que o DEHP possui um efeito positivo, fazendo com que a polimerização demore mais tempo para acontecer nas concentrações de 2,5 μM e 25 nM, sendo capazes de proteger o eritrócito da falcização.

Palavras-chave: Anemia Falciforme; Interferentes Endócrinos; DEHP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo da polimerização da desoxi-HbS	17
Figura 2: Fisiopatologia da anemia falciforme	20
Figura 3: Estrutura química do DEHP	26
Figura 4: Ilustração da metodologia utilizada para a realização do teste da polimerização da HbS	29
Figura 5: Ilustração geral do estudo.	34
Figura 6: Ilustração da molécula de DEHP se associando a valina.	42
Figura 7: Imagens captadas por microscopia eletrônica demonstrando a interferência do DEHP na polimerização da HbS.	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Curva de polimerização da HbS na presença de DMSO e na presença de DEHP	31
Gráfico 2: Taxa de polimerização da HbS na presença de DMSO e na presença de DEHP em quatro concentrações distintas.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de Hb em um indivíduo saudável.....	15
Tabela 2: Preparo dos controles utilizados no experimento.....	30

LISTA DE ABREVIACÕES

AF	Anemia Falciforme
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVC	Acidente vascular cerebral
ATBC	Acetil-Tri-n-butil-Citrato
BPG	Bisfosfoglicerato
CGAR	Cromatografia gasosa de alta resolução
CD36	Glicoproteína plaquetária
DEHP	Di(2-etilhexil)ftalato
DEHT	Di-2-ethylhexyl-terephthalate
DEHA	Di-2-etil-adipato
DINCH	1,2-ciclohexano-ácido-dicarboxílico-di-isononil-ster
DF	Doença falciforme
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	cido etileno diamino tetracético
FDA	Food and drug administration
GSH	Glutathiona 11
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbF	Hemoglobina F
HbS	Hemoglobina S
HU	Hidroxiuréia
HPLC	Cromatografia liquida de alta resolução
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAD	Nicotinamida
NO	Óxido nítrico
PS	Fosfatidilserina
PNTN	Portaria do ministério de saúde
PVC	Policloreto de vinila
RBC	Célula vermelha sanguínea
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SUS	Sistema único de saúde
STA	Síndrome torácica aguda
TCTH	Transplante de células troncos hematopoiéticas
TEHTM	Tri-(2-ethylhexyl) trimellitato
TN	Triagem Neonatal

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
δ	delta
γ	gama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Hemácias.....	15
1.2 Anemia e Doença falciforme	16
1.3 Fisiopatologia.....	18
1.4 Aspectos Clínicos.....	20
1.5 Diagnóstico e Tratamento	21
1.6 Bolsa de sangue.....	24
1.7 DEHP	25
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. METODOLOGIA	29
4.1 Análise Estatística	30
5. RESULTADOS	30
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÃO	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
9. APÊNDICE	41
9.1 Melhor Trabalho em Sessão de Apresentação do Campus Macaé na XLII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Tecnológica, Artística e Cultural (JITAC 2020 – Edição Especial).....	41
9.2 Menção Honrosa na 11ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ	41
10. ANEXO	42
10.1 Ilustrações de outros experimentos do mesmo grupo de pesquisa que comprovam os resultados obtidos.....	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hemácias

As hemácias, também conhecidas como eritrócitos, são células sanguíneas originadas através de uma diferenciação das células-tronco hematopoiéticas produzidas pela medula óssea. Inicialmente essas células se diferenciam em hemácias nucleadas que se tornam em eritrócitos maduros após a expulsão do núcleo e degradação do retículo endoplasmático (de Oliveira e Saldanha, 2010). São células anucleadas, bicôncavas, pequenas e flexíveis que possuem um tempo de vida útil de aproximadamente 120 dias na circulação sistêmica (Gomes et al., 2022).

As principais funções das células vermelhas são realizar as trocas gasosas, além de possuir sistemas antioxidantes com a presença de agentes redutores como o NADH e NADPH que mantêm a funcionalidade dessas células evitando danos eritrocitários, responsáveis pelo aparecimento de patologias perante a diversas exposições de lesões mecânicas ou metabólicas provocadas por uma sobrecarga oxidativa, principalmente pela oxidação e desnaturação da Hb (Machado et al., 2009).

A hemoglobina é o principal componente presente no eritrócito responsável pelas trocas gasosas que carrega o gás oxigênio (O₂) do pulmão para os tecidos e capta o dióxido de carbônico (CO₂) dos tecidos de volta para o pulmão, além de realizar o tamponamento de íons de hidrogênio (Monteiro et al., 2015). É formada por duas porções: a porção heme que contém um átomo de ferro capaz de se ligar reversivelmente a uma molécula de oxigênio e a porção proteica, denominada globina, que consiste em quatro cadeias polipeptídicas onde cada uma delas está ligada a um grupo heme. Sendo assim, cada molécula de Hb pode se associar com quatro moléculas de oxigênio (Santos e Chin, 2012). Alguns fatores influenciam na afinidade do oxigênio pela Hb como o pH, a concentração de CO₂, 2,3-bifosfoglicerato (BPG) e a temperatura (Machado et al., 2021).

Tabela 1: Tipos de Hb em um indivíduo saudável.

Tipos de Hb	Composição	Concentração
HbA	$\alpha_2\beta_2$	96% da Hb total do organismo
HbA2	$\alpha_2\delta_2$	Produzida após o primeiro trimestre do nascimento e

		corresponde cerca de 2,5 a 3% da Hb total
HbF	$\alpha 2\gamma 2$	Baixas concentrações durante a vida adulta

Fonte: Monteiro et al., 2015.

Durante o processo de evolução, começaram a surgir algumas alterações nas hemoglobinas, conhecidas como hemoglobinopatias, proveniente de alterações genética nos ácidos nucleicos que fornecem a sequência codificante necessária para a formação dos polipeptídios alfa, beta, gama e delta da Hb (Chinelato-Fernandes e Bonini-Domingos, 2005). Essas hemoglobinopatias formam um grupo de doenças autossômicas recessivas que englobam, por exemplo, a talassemia, uma anemia crônica ocasionada por uma síntese reduzida da cadeia globina que diminui a produção de Hb e a doença falciforme (DF) ocasionada por substituições estruturais na cadeia globina (Batista et al., 2020).

1.2 Anemia e Doença falciforme

A anemia é uma alteração patológica decorrente da redução da massa eritrocitária e conseqüentemente da massa de Hb corporal (Santis, 2019). A anemia falciforme (AF) é uma anemia hereditária causada por uma mutação genética que leva a formação da HbS, caracterizada pela presença de eritrócitos em forma de foice, com tempo de vida médio de 7 a 25 dias, predominantemente encontrada em indivíduos negros e pardos (Holsbach et al., 2010).

Durante o processo de escravização de negros africanos, o gene da HbS se espalhou pelo mundo, sendo atualmente mais encontrada na África, Índia, Arábia Saudita e no Brasil, tendo sua maior incidência no Estado da Bahia. Devido à miscigenação dos povos a HbS também pode ser encontrada em pessoas caucasianas (Cavalcanti e Maio, 2011).

Conhecida como uma doença molecular, a AF é ocasionada por uma mutação na posição 6 da cadeia β -globina, onde ocorre a substituição entre duas bases nitrogenadas, adenina por uma timina (GAG->GTG) que resulta codificação de uma valina em vez de ácido glutâmico (Galiza Neto e Pitombeira, 2003).

É considerada uma hemoglobinopatia hereditária, podendo ser de herança homozigótica ou heterozigótica, que vai determinar a gravidade da doença. A forma

homozigótica é quando a HbS se associa a outra HbS (HbSS) e apresentam a AF, enquanto os heterozigotos possuem apenas o traço falciforme e normalmente não apresentam sintomatologia (Ferraz e Murao, 2007).

O primeiro relato científico acerca da DF foi descrito pelo médico James Bryan Herrick em 1910, onde se observou que as hemácias possuíam um aspecto alongado em forma de foice ligados com sintomas de anemia, icterícia e dores intensas relatadas por um jovem negro. Entretanto, foi apenas em 1949 que Linus Pauling a considerou como uma doença molecular tendo em vista que a HbS apresentava uma mobilidade eletroforética anormal (Cavalcanti e Maio, 2011).

A modificação fisiopatológica da hemácia provoca sua destruição precoce e a obstrução do fluxo sanguíneo nos capilares, causando diversas manifestações clínicas características da DF, como por exemplo a vaso-oclusão, provocada pela polimerização da HbS (Figura 1). A vaso-oclusão está associada com interações entre eritrócitos, células endoteliais, leucócitos e plaquetas, além de citocinas e fatores teciduais (Monteiro et al., 2015).

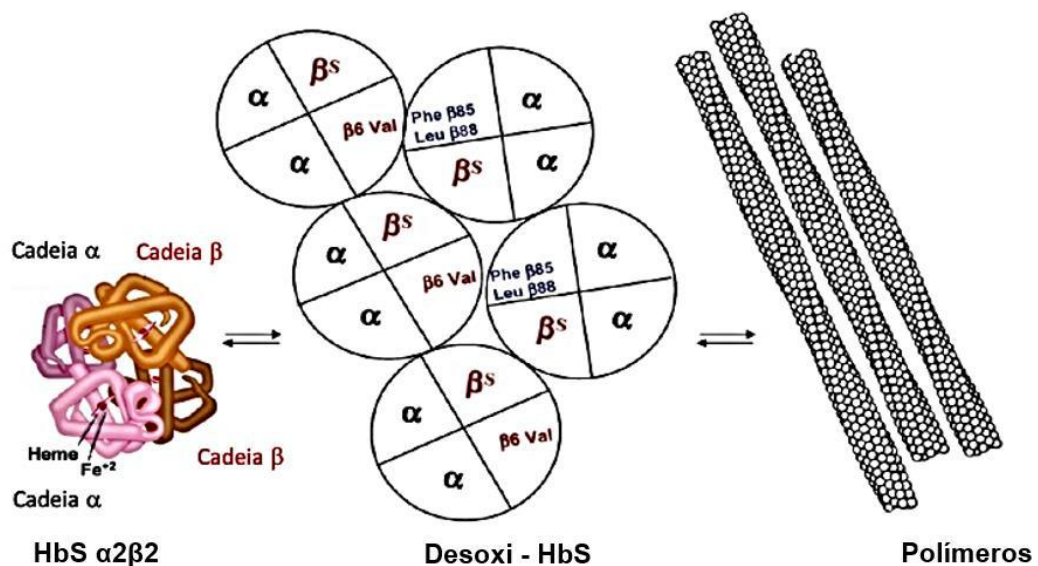


Figura 1: Mecanismo da polimerização da desoxi-HbS. Fonte: Adaptado de ODIÈVRE et al., 2011.

A polimerização da HbS dentro das hemácias é o evento fundamental na patogenia da DF, resultando na alteração da forma do eritrócito e na redução de sua deformabilidade. É responsável por encurtar seu tempo de vida útil, deixando-as mais frágeis e rígidas o que dificulta a aderência do oxigênio na Hb, prejudicando a

oxigenação sanguínea que origina a falcização dos eritrócitos quando ocorre completa desoxigenação das células (Souza, 2020).

A velocidade e difusão de formação desses polímeros dependem de quatro variáveis: a presença ou ausência de HbF, o grau de desoxigenação da célula, a concentração de Hb intracelular (Figura 1) e a atuação do 2,3-BPG (Bunn, 1997). A função do 2,3-BPG é reduzir a afinidade da Hb pelo oxigênio a fim de promover sua liberação para os tecidos. Como a DF já induz uma redução dessa afinidade do O₂ pela Hb, ocorre um aumento da intracelular de 2,3-BPG, promovendo maior liberação de oxigênio, prejudicando o quadro de oxigenação dos pacientes falciformes (Machado et al., 2021).

No Brasil, estima-se 4 milhões de portadores do gene da HbS, onde anualmente nascem 3.500 crianças portadoras da DF e 200.000 com traço falciforme (Amaral et al., 2015). Apresenta uma alta taxa de mortalidade em lactantes e crianças, jovens e adultos. Estudos recentes descrevem que nos últimos 19 anos a mortalidade média entre os anos de 2000 a 2018 foram de 1,92 milhão para homens, e 1,85 milhão para mulheres, dentre eles 27,5 % óbitos na faixa pediátrica e 10,4% antes dos cinco anos de idade (Santo, 2022).

1.3 Fisiopatologia

As moléculas de HbS em grande quantidade e em condições de hipóxia, se associam facilmente em feixes de “cristais” e formam polímeros de filamentos duplos, causando modificações em sua estrutura, que formam pequenos agregados de Hb polimerizada em forma de foice, responsável pelas deformações das células falciforme. Diferente da HbA e da HbF que mesmo em alta concentração, não resultam em polimerização quando ocorre a desoxigenação das células (Zago e Pinto, 2007).

O fenômeno da falcização não é instantâneo, pois a hemácia é capaz de retornar a sua forma bicôncava após a reoxigenação. Essa condição efetua-se somente na forma desoxigenada da HbS, pois a frequente polimerização e despolimerização realizam lesões de membrana nas hemácias, que não retornam a sua forma normal mesmo com a reoxigenação, sendo um fenômeno consequente de um retardo na circulação sanguínea e da vaso-oclusão (Machado et al., 2021).

Todavia, a formação desses polímeros que provocam a falcização não dependem apenas da desoxigenação, mas também outras alterações nas hemácias, sendo elas: o efluxo de potássio, o aumento do cálcio intracelular, a formação de polímeros da Hb ligadas com proteínas da membrana; além da exposição de fosfatidil-serina (PS) e CD36 (glicoproteína plaquetária), moléculas de adesão da membrana celular que a torna mais aderente que os eritrócitos normais (Zago e Pinto, 2007).

É na membrana que se manifestam as alterações moleculares provocadas no interior da célula. Dessa maneira, a vaso-oclusão viabiliza a hipóxia e provoca inflamação através do aumento de moléculas de adesão na superfície das hemácias que favorece uma interação com o endotélio e com outros componentes da circulação, como as plaquetas (Stypulkowski e Manfredini, 2010).

As células endoteliais são ativadas por meio do contato direto dos eritrócitos falciformes, Hb livres e espécies reativas de oxigênio provocadas pela hipóxia (Kato et al., 2018). Recorrentes vaso-oclusões conduzem a contínuas respostas inflamatórias na DF, que se propagam por altos níveis de citocinas inflamatórias e estresse oxidativo (Conran et al., 2009).

Fisiologicamente, o estresse oxidativo estimula o enrijecimento do eritrócito e a instabilidade membrana que reduz seu tempo de circulação sanguínea através de lesões microvasculares que aumentam a hemólise (Amer e Fibach, 2005). A hemólise é conceituada pelo rompimento da membrana eritrocitária que permite o extravasamento da Hb e de outros componentes do sangue no plasma (Souza et al., 2016). Essa Hb liberada se associa a um vasodilatador responsável pela regulação do tônus vasomotor, o óxido nítrico (NO), reduzindo sua biodisponibilidade que prejudica a inibição plaquetária e estimula a coagulação, contribuindo para a vasoconstrição e a vaso-oclusão pertencentes as manifestações clínicas da DF (Figura 2) (Cerqueira et al., 2010).

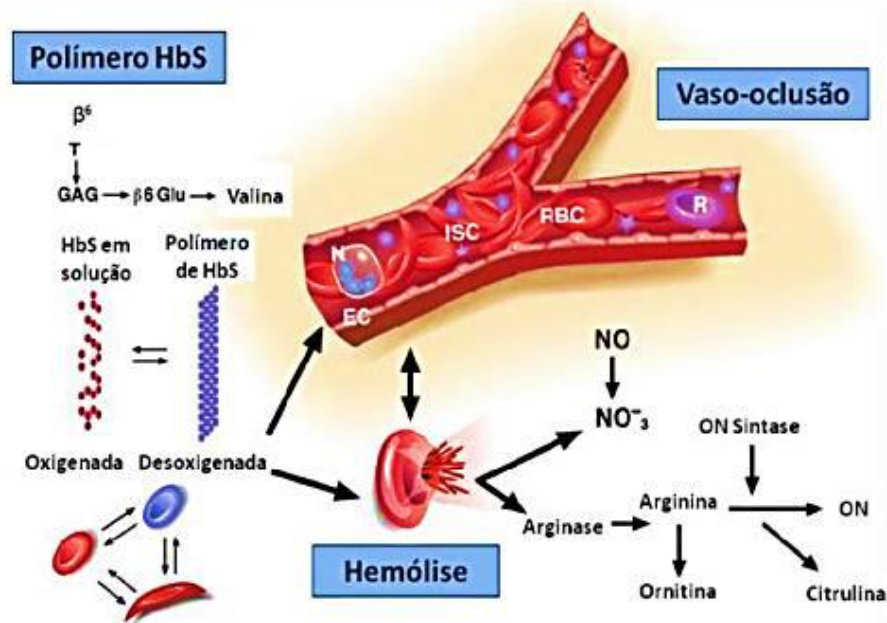


Figura 2: Fisiopatologia da anemia falciforme. A mutação na posição 6 no gene da beta globina leva a formação da HbS. Em situação de desoxigenação a HbS sofre polimerização. O polímero de HbS danifica o eritrócito, diminuindo sua vida útil provocando a hemólise que aumenta o consumo de óxido nítrico (NO) favorecendo a coagulação sanguínea e levando os eritrócitos falciformes a aderirem aos vasos ocasionando a vaso-oclusão. Fonte: Adaptado de Steinberg, 2008.

1.4 Aspectos Clínicos

As manifestações clínicas da DF derivam diretamente da anormalidade molecular representada pela presença da HbS (Holsbach et al., 2010). Ela se inicia após o sexto mês de vida por conta da redução dos níveis de HbF relacionada com diversas complicações associadas. Durante as crises pode haver dor intensa, lesões isquêmicas teciduais e o acometimento dos sistemas linfo-hematopoético, pulmonar, cardiovascular, gastrointestinal e o sistema nervoso central (Salomão et al., 2022; Pecker e Little, 2018).

Algumas manifestações clínicas da DF não impactam na expectativa de vida, mas compromete a qualidade de vida desses pacientes, como as úlceras de pernas, retinopatia, necrose óssea (especialmente na cabeça do fêmur) e os cálculos biliares resultante da elevada destruição dos eritrócitos (Zago e Pinto, 2007). Entretanto, possuem outras complicações que afetam a função de alguns órgãos vitais e aumentam o risco de vida, dentre elas destacam-se as crises vaso-oclusivas dolorosas resultantes em isquemia, infarto e lesão de múltiplas de órgãos e tecidos;

infecções e febre causada pelos microrganismos, vírus e bactérias encapsulados resistentes e de difícil tratamento por conta da desoxigenação dos vasos sanguíneos, acidentes vasculares cerebrais (AVC), complicações cardiorrespiratórias como a insuficiência cardíaca congestiva e a síndrome torácica aguda (STA), hipertensão pulmonar, insuficiência renal (Zago e Pinto, 2007; Maioli et al., 2016; Ballas et al., 2010).

A STA se compara a pneumonia, associada a sinais e sintomas de tosse, dor torácica, febre, dispneia, piora da anemia, leucocitose e crepitações nos pulmões. A hipertensão pulmonar é a causa mais comum de óbito em adultos, incluindo hemólise, hipóxia crônica, tromboembolismo, asplenia, dentre outros, provocando o aumento pressão arterial pulmonar e venosa (Howard e Oteng-Ntim 2012; Maioli et al. 2016; Machado, 2015).

Dentre outras complicações agudas e crônicas estão os eventos de dor aguda que geralmente afetam as extremidades, peito e costas; priapismo (ereção prolongada e dolorosa do pênis), icterícia e esplenomegalia (Daak et al., 2016).

Em relação os diferentes eventos anêmicos relacionados com a DF, encontram-se a crise de sequestro esplênico agudo que provoca o inchaço do baço e hipovolemia por conta da retenção de sangue diminuindo drasticamente os níveis de Hb; crise aplástica (ausência temporária de eritropoiese) e crise hiper-hemolítica (Trueland, 2014; Brousse et al., 2012).

1.5 Diagnóstico e Tratamento

A Portaria do Ministério da Saúde nº 822/01 (PNTN) determina as normas para o diagnóstico da DF que se baseia na detecção da HbS. Inicialmente, é utilizada a triagem neonatal (TN), mais conhecida como "Teste do Pezinho", que objetiva diagnosticar precocemente os neonatos, através da realização do exame laboratorial, realizando uma busca de casos suspeitos, a confirmação diagnóstica, permitindo o início de tratamento e um acompanhamento multidisciplinar, a fim de diminuir a mortalidade desses pacientes (Mendonça et al., 2009). O tempo padronizado para a realização do teste é entre o 3º e o 5º dia de vida e não deve ultrapassar 28 dias após o nascimento (Saramba et al., 2019).

Os programas de triagem também utilizam de outros procedimentos para colaborar com o diagnóstico, tais como: a eletroforese em acetato de celulose com pH alcalino, seguida da eletroforese em ágar citrato em pH ácido. Essa metodologia permite diferenciar as HbA da HbF e de algumas outras variantes como a HbS e utiliza a eletroforese em ágar citrato em pH ácido para confirmar o diagnóstico (Ferraz e Murao, 2007). Além disso, há técnicas mais recentes de confirmação que consistem na utilização de eletroforese por focalização isoeétrica e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) (Saramba et al., 2019).

Para o tratamento da DF podem ser realizadas algumas intervenções de cunho preventivo ou paliativo que tendem a reduzir seus sintomas e aumentam a expectativa de vida desses indivíduos, dentre eles o uso de alguns medicamentos e adjuvantes, tais como: a suplementação com arginina; medicamentos quelantes de ferro; ácido fólico, analgésicos e anti-inflamatórios, havendo em último caso a necessidade de realizar a transfusão sanguínea (Salomão et al., 2022).

Atualmente, o único tratamento que visa a cura da DF é o Transplante de Célula-Tronco Hematopoiéticas (TCTH), indicado para casos graves como, por exemplo, ocorrência de AVC na infância e crises dolorosas intensas que tenham doador compatível na família (Zúñiga et al., 2018).

A hidroxiureia (HU) é o principal medicamento utilizado nesse quadro clínico, tendo em vista que atua nos mecanismos patogênicos apesar de não levar a cura da doença. Dessa forma, este fármaco é responsável por aumentar a HbF que reduz quantitativamente os valores de HbS; aumentar as concentrações de Hb, do volume corpuscular médio e a hidratação dos glóbulos vermelhos capaz de reduzir a expressão das moléculas de adesão e a quantidade de reticulócitos que está elevada em anemias hiperproliferativas como essa (Sant'Ana et al., 2017). Com isso, contribui significativamente para diminuição da hemólise e aumento do óxido nítrico, amenizando os processos de vaso-oclusão e da impotência das microcirculações. Esse medicamento se encontra disponível pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Arduini et al., 2017).

Contudo, a utilização desse medicamento induz a depressão na medula óssea, sendo necessária a monitorização rigorosa dos índices de leucócitos e plaquetas para avaliar seu uso, além do elevado risco de toxicidade hematológica, a qual possui grande potencial carcinogênico e teratogênico. Recomenda-se uma administração

oral inicial de 15 mg/kg/dia, em dose única. Havendo a necessidade, pode-se aumentar a dose em 5 mg/kg/dia a cada 4 semanas até atingir a dose máxima de 35 mg/kg/dia. Há possibilidade de suspensão caso o paciente apresente: toxicidade hematológica, letargia, cefaleia, tonturas, desorientação, estomatite, alucinações, náusea, vômitos, diarreia e constipação, elevação de níveis de ureia e creatinina, elevação das aminotransferases/transferases, mielotoxicidade e hiperesplenismo em crianças (Salomão et al., 2022).

Em 2019, foi aprovado outros dois medicamentos pela Food and Drug Administration (FDA): crizanlizumabe e voxelotor. O crizanlizumabe é um anticorpo monoclonal, que tende a reduzir as dores causadas pelas crises vaso-oclusivas desses pacientes (Figueiredo e Alves, 2022). Seu objetivo é bloquear a P-selectina, uma molécula de adesão expressa pelos eritrócitos (Tisdale et al., 2020).

O voxelotor atua modulando a afinidade da Hb pelo oxigênio por meio da inibição da cadeia alfa da Hb, sendo capaz de manter os eritrócitos em sua forma oxigenada, bloqueando a polimerização, a falcização e destruição eritrocitária. Dessa maneira, quadros reduzidos de falcização promovem um aumento da meia vida dos eritrócitos, diminui a viscosidade sanguínea, a hemólise e conseqüentemente o quadro anêmico dos pacientes (Herity et al., 2021).

A reposição de glutamina também é benéfica, pois é um aminoácido que estimula a produção de arginina, nicotinamida (NAD) e glutathione (GSH). Essas moléculas estão envolvidas no mecanismo de proteção dos agravos vasculares oxidativos, reduzindo os quadros de dor aguda e internações (Piccin et al., 2019).

Da mesma forma que se faz necessário o uso de penicilina oral em crianças com AF desde o diagnóstico até os 5 anos de idade a fim de evitar infecções, já que as infecções por *Streptococcus pneumoniae* são frequentes devido ao aumento da susceptibilidade por acometimento funcional do baço (Zago e Pinto, 2007).

Além disso, alguns pacientes com AF necessitam de transfusões sanguíneas realizadas a longo prazo, a fim de suprimir a produção eritrocitária da medula em quadros permanentes de síndromes pulmonares agudas e de outras manifestações não solucionadas com a HU, com objetivo de prevenir quadros de AVC (Pinto et al., 2019).

A terapia consiste em receber eritrócitos de doadores que possuem uma concentração normal de HbA e assegurar uma quantidade de oxigênio suficiente para os tecidos, onde o objetivo é manter a HbS abaixo de 30% no organismo, principalmente nos casos graves de gravidez, AVC, crise aplástica, cirurgia, hipóxia com síndrome torácica aguda, priapismo ou entre outros (Zúñiga et al., 2018). Nas crianças, a transfusão pode reduzir de 60 a 80% as células falciformes circulantes. Nesses casos, o acúmulo de ferro é inevitável e para isso são usados os quelantes de ferro, por via oral com deferiprona e deferasirox ou por via parenteral com desferoxamina (Cançado, 2007).

Ademais, deve ser levado em consideração os riscos inerentes às transfusões sanguíneas, tais como: transmissão de patógenos; reações transfusionais e a aloimunização; alto risco de infecções; lesão pulmonar aguda e próprios erros de administração (tipo sanguíneo e correspondência errado, identificação incorreta do paciente) que podem causar reações hemolíticas (Hajjar et al., 2007).

1.6 Bolsa de sangue

O plástico substituiu o vidro como recipiente alternativo para coletar e armazenar o sangue e seus hemoderivados há mais de 50 anos, onde essa inovação aprimorou a segurança das transfusões sanguíneas em relação ao vidro, permitindo o fracionamento do sangue e facilitando a armazenamento, reduzindo o desperdício proveniente das quebras ocasionais; contaminação microbiana e o risco de embolia durante a transfusão (Prowse et al., 2014; Serrano et al., 2016).

As bolsas de sangue conferem-se em um sistema fechado constituído por um recipiente estéril e apirogênico, provido de tubo de coleta, agulha e tubos de saída. São registradas por tipo de plástico e devem ser associadas com solução anticoagulante e solução preservadora. São regulamentadas pela RDC nº35/2014 e devem estar conformes para obtenção e revalidação do registro na Anvisa, tendo essa conformidade comprovada por laudos técnicos emitidos pelo INCQS, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (BRASIL, 2014).

De acordo com essa RDC, as bolsas plásticas precisam ser isentas de toxicidade, transparentes, sem adição de pigmentos ou corantes, flexíveis e resistentes para as condições de uso e estocagem, capaz de serem mantidas estáveis

biológica, química e fisicamente durante o período de validade e sem permitir a entrada de microrganismos. Ademais, não podem liberar nenhuma substância acima dos limites especificados para a solução anticoagulante, e preservadora de sangue (BRASIL, 2014).

Possuem uma classificação de risco associado à utilização dos dispositivos médicos, a qual oferecem alto risco à saúde do usuário, sendo consideradas segundo a ANVISA como produtos de classe III (BRASIL, 2001). Por ser um insumo essencial inerente a hemoterapia, elas fazem parte do programa estratégico de sangue e hemoderivados, criado pelo Ministério da Saúde, pois algum desvio da qualidade nesse produto tende a comprometer um grande número de pessoas, gerando um imensurável dano na saúde pública (BRASIL, 2013a; BRASIL, 2017a).

Segundo a Farmacopeia Europeia, a embalagem dos materiais médicos que contém sangue e suas frações só podem conter um único tipo de plástico empregado, o PVC, mais conhecido como policloreto de polivinila (Serrano et al., 2016). Por conta de suas propriedades, o PVC é um polímero que atende algumas exigências de conservação e processamento de sangue devido à sua durabilidade capaz de suportar a centrifugação e a pressão de infusão, além de ser resistente às temperaturas de esterilização e de congelamento do plasma (Prowse et al., 2014).

O PVC é constituído por 57% de cloro oriundo do sal marinho e 43% de eteno proveniente do petróleo. A reação dessas substâncias forma o dicloroetano (DCE) que é modificado em um monômero de cloreto de vinila (MVC). Esse MVC é submetido a polimerização sendo capaz de formar o PVC, um pó fino branco e inerte. Por conta de suas características físico-químicas, ele não é processável e deve ser combinado com algum aditivo como os plastificantes a fim de reduzir a intensidade das ligações entre as moléculas do polímero conhecidas como força de *Van der Waals*, responsáveis pela elevada rigidez do PVC. Com isso, a diminuição dessas forças reduz a atração intermolecular e confere ao produto final dureza, flexibilidade, transparência e estabilidade térmica (Carvalho, 2018).

Atualmente, o plastificante DEHP é o mais utilizado em bolsas para coleta de células vermelhas e seus componentes (Prowse et al., 2014).

1.7 DEHP

Os aditivos (plastificantes) utilizados em embalagens plásticas são substâncias empregadas na produção de polímeros para modificação da estrutura polimérica a fim de incrementar algumas propriedades e reduzir os custos. São compostos de baixa massa molecular que ficam dispersos na matriz polimérica, realizando fracas interações. Deve ser economicamente viável, além de não conferir risco para a saúde do consumidor (Monteiro e Gotardo, 2005).

O principal grupo de plastificantes utilizados na produção do PVC são os ftalatos, principalmente o di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) (Figura 3). O DEHP é conhecido como um interferente endócrino que possui aspecto líquido oleoso, baixa volatilidade, boa compatibilidade, elevada resistência aos métodos de esterilização e à água, capaz de proporcionar alta transparência ao PVC imprescindível nas aplicações de dispositivos médicos e possui excelente custo-desempenho (Carvalho, 2018).

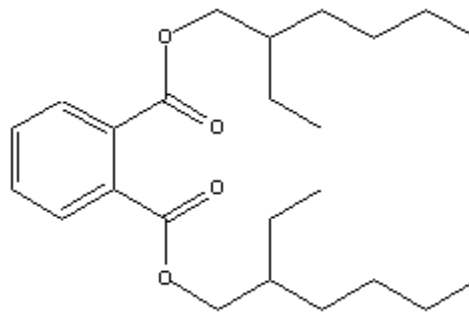


Figura 3: Estrutura química do DEHP.

As maiores fontes de exposição ao DEHP incluem produtos de uso doméstico, como os brinquedos; embalagens de alimentos e dispositivos médicos, como bolsas para administração intravenosa de fluidos e sangue; tubos endotraqueais e cateteres e os dispositivos de proteção como as luvas e as máscaras de oxigênio (Lozano e Cid, 2013) e Tickner et al., 2001).

Uma das características dos ftalatos é que estes não se ligam covalentemente aos plásticos, o que os torna altamente suscetíveis a migrarem do produto médico durante o contato com sangue e/ou outras substâncias lipofílicas, além de serem liberados na atmosfera, nos alimentos ou fluidos corporais (Azevedo, 2016). A RDC nº35/2014 preconiza os limites aceitáveis de DEHP extraível das bolsas de sangue, sendo eles:

“I - o limite de 10 mg/100 ml (dez miligramas por cem mililitros) para recipientes de capacidade nominal maior que 300 ml (trezentos mililitros) e menor que 500 ml (quinhentos mililitros);

II - o limite de 13mg/100 ml (treze miligramas por cem mililitros) para recipientes de capacidade nominal maior que 150 ml (cento e cinquenta mililitros) e menor que 300 ml (trezentos mililitros); e

III - o limite de 14 mg/100 ml (quatorze miligramas por cem mililitros) para recipientes de capacidade nominal menor que 150 ml (cento e cinquenta mililitros).” (BRASIL, 2014).

A contaminação por DEHP pode ocorrer através das vias intravenosa, oral, dérmica e respiratória (Erythropel et al., 2014). Esses interferentes endócrinos ao entrar em contato com o ser humano, podem provocar diversos efeitos tóxicos causando modificações no sistema endócrino, tais como: distúrbios no metabolismo da glicose, disfunção tireoidiana, má formação congênita e outros. Seus efeitos à nível vascular ainda não são bem conhecidos, mas há relatos de impacto hepatotóxico e cardiotoxico (Queiroz, 2015; Sant’ana et al., 2017).

Por conta de seus efeitos colaterais, nas últimas décadas surgiram preocupações sobre a interferência desses plastificantes no ser humano e sua distribuição vem sendo controlada pela União Europeia (Carvalho, 2018).

Entretanto, alguns estudos apontam que, inesperadamente, o DEHP apresenta alguns efeitos benéficos no armazenamento de sangue, contribuindo para uma redução da taxa de hemólise e uma melhor recuperação das hemácias. Não se sabe ao certo o que promove esses efeitos, mas especula-se que é por conta da lipofilicidade do DEHP que adentra facilmente nas bolsas, podendo aderir e estabilizar as membranas dos eritrócitos (Serrano et al., 2016).

Algumas alternativas de plasticantes estão sendo propostas para substituir o uso de DEHP em produtos médicos, tais como: o TOTM, di(2- etil-hexil)tereftalato (DEHT), 1,2-ciclohexano-ácido-dicarboxílico-di-isononil-éster (DINCH), di-2-etil-adipato (DEHA), acetil-tri-n-butil-citrato (ATBC) e o tri(2-etilhexil) trimelitato (TEHTM) (Haishima et al., 2014; Prowse et al., 2014).

Existem técnicas cromatográficas utilizadas para determinação de

plastificantes como a cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) e o HPLC. Dessa maneira, o controle de limites aceitáveis desses componentes e a validação de metodologias confiáveis para avaliação da migração de aditivos se faz necessária para a utilização desses plastificantes em dispositivos médicos (Bernard et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA

A AF é uma doença genética que altera o formato das hemácias e reduz a oxigenação das células afetando a expectativa de vida de seus portadores. Dessa forma, o paciente é exposto a uma série de tratamentos, dentre eles, o uso de alguns medicamentos como a HU e a transfusão sanguínea constante em casos mais graves.

As bolsas de sangue são feitas de PVC com a adição de plastificantes que permitem maior flexibilidade do material e auxilia na sua preservação. Por conta disso, faz-se necessário analisar a composição dessas bolsas a fim de observar como os plastificantes presentes nelas interferem na qualidade do material armazenado, tendo em vista que um paciente falciforme já é bastante debilitado para receber um sangue que tenha suas propriedades alteradas por conta do seu armazenamento.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do DEHP em eritrócitos de pacientes falciformes.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar se a Hb isolada é capaz de interagir com o DEHP;
- Avaliar se o DEHP é capaz de modular a polimerização da HbS dentro dos eritrócitos de pacientes falciformes.

4. METODOLOGIA

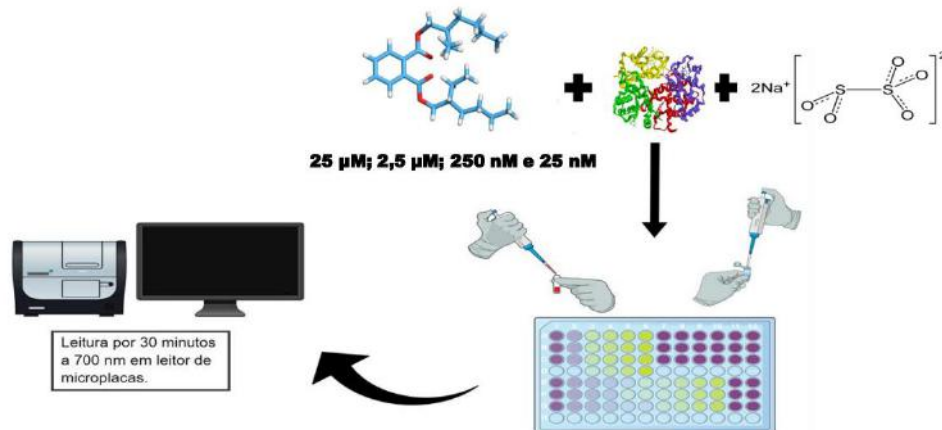


Figura 4: Ilustração da metodologia utilizada para a realização do teste da polimerização da HbS.

Com o intuito de analisar a interferência do DEHP foi realizado o teste de polimerização da HbS para quantificar o teor de polimerização da Hb quando tratada com as substâncias de interesse, através da técnica de espectrofotometria que analisa a densidade óptica (turbidez) x tempo.

Para a realização do teste é utilizada uma microplaca com 96 poços para Elisa contendo solução de Hb de 1 mg/mL em PBS (fabricante Nova Biotecnologia LTDA) sendo submetida a quatro concentrações finais de DEHP, sendo elas: 25 µM; 2,5 µM; 250 nM e 25 nM. No final é realizado um disparo contendo metabissulfito de sódio (2%) obtido do fabricante Isofar (Indústria e comércio de Produtos químicos LTDA).

O metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) é diluído em PBS, ficando com a concentração final de 2%. Ele atua como substância redutora, pois ao entrar em contato com as hemácias extrai o oxigênio provocando desoxigenação química, que induz os eritrócitos HbS a assumir o formato de foice. No momento que ocorre seu disparo na placa, contendo o DEHP e Hb, ocorre o início do processo de polimerização. Dessa maneira, é primordial o uso de pipeta multicanal para garantir que todos as amostras polimerizem ao mesmo tempo.

Após o disparo de metabissulfito de sódio, a placa foi encaminhada para leitura em leitor de microplacas (Tecan GENios), em um comprimento de onda de 700

nanômetros de absorvância a cada 1 minuto por aproximadamente 30 minutos (n=6). Os experimentos foram realizados em triplicatas.

As concentrações de DEHP utilizadas nesse experimento foram baseadas no relato científico japonês que aborda sobre a avaliação e análise dos níveis de exposição de di(2-etilhexil) ftalato de bolsas de sangue. As quatro concentrações utilizadas se comparam com as concentrações descritas na literatura que vazam das bolsas de sangue e entram em contato com o eritrócito (Inoue et al., 2005).

O volume final dos poços foi de 100 ul. A Hb pura e o DEHP foram obtidos do fabricante Sigma Aldrich Brasil Ltda. Os controles foram preparados conforme a tabela abaixo:

Tabela 2: Preparo dos controles utilizados no experimento.

Controles	Composição
Controle negativo (representado em preto nos gráficos)	Contém 1 ul de Hb pura e 99 ul de PBS.
Controle positivo (representado em cinza)	Contém 1 ul de Hb pura, 98,5 ul de metabissulfito de sódio e 0,5 ul de DMSO, solvente utilizado para dissolver o DEHP
Substância a ser testada (representado em verde)	Contém 1 ul de Hb pura e 98 ul de metabissulfito de sódio.

4.1 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prisma 5. A curva de polimerização da HbS foi feita a partir do cálculo da curva não linear, calculada pela equação polinomial de quarta ordem, com intervalo de 95%. Foi realizada ANOVA e pós teste de Tukey para analisar a significância estatística dos resultados obtidos (* para $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$, quando comparado ao controle, com intervalo de confiança de 95%).

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos *in vitro* apresentaram que o DEHP interage diretamente com a Hb isolada do paciente falciforme onde em altas concentrações como de 25 uM, pode-se observar que o DEHP começa a polimerizar a HbS antes dos 10 minutos

quando comparado ao controle (demonstrado em cinza). Dessa maneira, atua adiantando o tempo de início de polimerização da Hb, provocando um aumento da polimerização (gráfico 1a).

Em contrapartida, ao diminuir a concentração de DEHP para 2,5 μM começa a ocorrer um atraso na curva de polimerização em relação ao controle. Porém, se faz importante analisar que essa diminuição não altera a polimerização em sua magnitude tendo em vista que ela vai acontecer, entretanto como a curva do gráfico está sendo desviada para a direita, significa que a presença do DEHP provoca um retardo no início da polimerização fazendo com que a HbS demore mais tempo para começar a polimerizar, atuando como um efeito protetivo para o eritrócito. O mesmo se observa para as demais concentrações de DEHP testadas (gráfico 1b-d).

Gráfico 1: Avaliação da polimerização da HbS na presença de DEHP

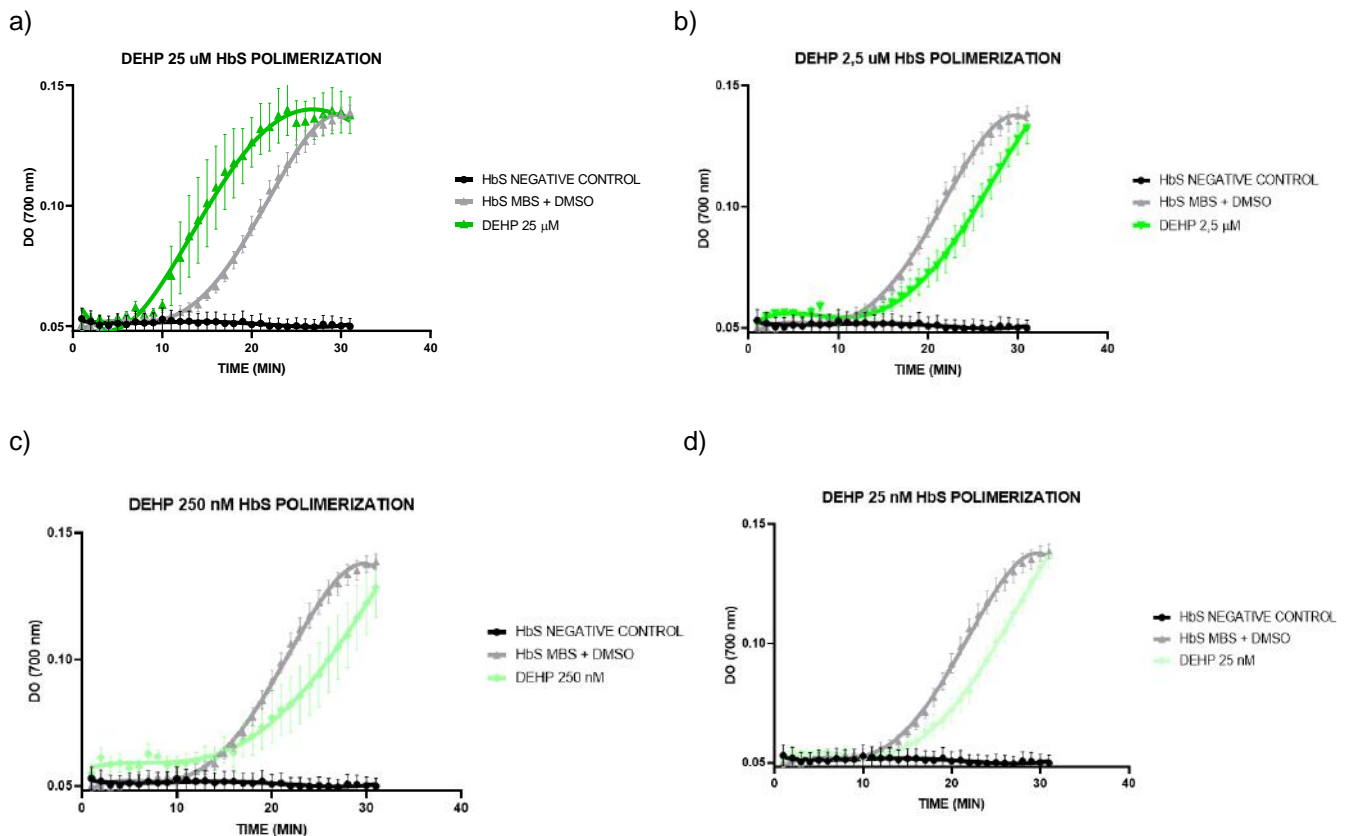


Gráfico 1: Curva de polimerização da HbS na presença de DMSO (solvente) e na presença de DEHP. Representação em preto dos dados controle, representação em verde dos dados com DEHP: a) DEHP 25 μM b) DEHP 2,5 μM , c) DEHP 250 nM, d) DEHP 25 nM. Eixo y densidade óptica de 0,05 a 0,15; eixo x tempo de 0 a 30 minutos, N=6. A leitura foi feita por leitor de Elisa Tecan GENios com 700 nm de absorvância.

A análise de AUC (área sob a curva) do experimento é resultante da integração de todos os pontos analisados na pesquisa capaz de computar a sensibilidade e a especificidade do estudo, simultaneamente. Essa análise reforça os resultados obtidos, demonstrando que nas menores concentrações utilizadas no estudo, como de 2,5 μM e 25 nM de DEHP, ocorreu um retardo na polimerização de forma significativa, como expresso no gráfico 2.

Gráfico 2: Área sobre a curva polimerização de HbS tratada com DEHP

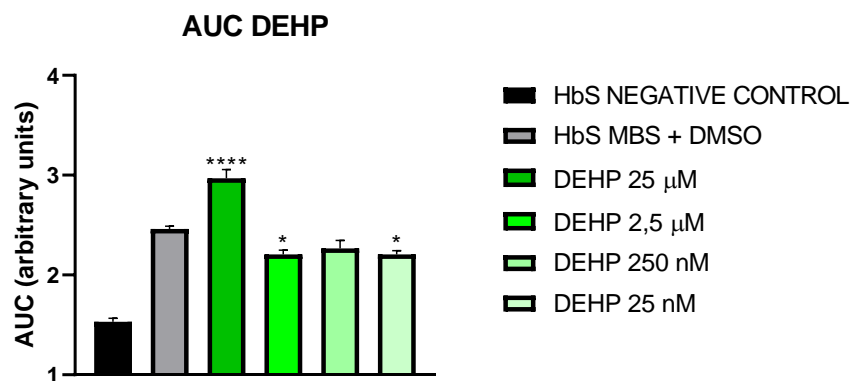


Gráfico 2: Taxa de polimerização da HbS na presença de DMSO (solvente) e na presença de DEHP em quatro concentrações distintas. *Representação em preto dos dados controle, representação em verde dos dados com DEHP.* A leitura foi feita por 30 pontos a 700 nm de absorvância. N =6. Resultados expressos em SEM \pm Err. * p <0.05, * p <0.01 e ** p <0.001 vs controle, com 95% de intervalo de confiança. One way anova e pós teste de Tukey."

6. DISCUSSÃO

A polimerização da Hb é um fator determinante para a ocorrência da AF, que compreende o mecanismo da falcização (Eaton and Bunn, 2017). O experimento realizado *in vitro* estabeleceu uma ligação benéfica do DEHP presente nas bolsas de sangue com a Hb isolada dos pacientes falciformes capazes de diminuir a taxa polimerização em algumas concentrações estudadas. De acordo com a literatura, um pequeno intervalo na polimerização é o bastante para interromper a agregação das moléculas, fator esse capaz de evitar as consequências causadas pela DF (Olubiyei et al., 2019).

Considera-se que 50% dos pacientes com DF necessitam receber tratamento transfusional e cerca de 5% a 10% destes necessitam de transfusão crônica (Pinto et al., 2011). Perante esses dados observa-se que grande parte dos pacientes falciforme

em algum momento do tratamento vai necessitar da transfusão sanguínea e por conta disso surge a preocupação em analisar como o DEHP presente no material dessas bolsas afeta o sangue armazenado.

De acordo com a literatura, o DEHP não se liga quimicamente ao plástico e pode adentrar nas membranas dos eritrócitos armazenados nas bolsas de sangue capaz de reduzir a lesão de armazenamento de eritrócitos e provocar uma melhor recuperação das hemácias. Seus níveis aumentam de acordo com o tempo de armazenamento e variam de acordo com a temperatura, sendo mais alto no sangue total e, em seguida, nos concentrados de hemácias (Tzounakas et al., 2018). Segundo Inoue e seus colaboradores, o nível de exposição humana ao DEHP liberada das bolsas de sangue é de 0,7 mg/kg peso/tempo, levando em consideração um paciente de 50 kg transfundido com 400 ml de sangue (Inoue et al., 2005). Em nossos resultados obtidos, como visto no gráfico 1, demonstra que o DEHP se liga ao eritrócito e afeta a taxa de polimerização da Hb, uma nova perspectiva da ação do DEHP em relação ao que é descrito na literatura.

Alguns achados científicos demonstram que o DEHP ao entrar em contato com ser humano através da transfusão pode causar efeitos nocivos como toxicidade reprodutiva, hepatotoxicidade, teratogenicidade, malignidades hepáticas, renais e alterações na reatividade cardiovascular visualizados em modelos animais (Queiroz, 2015; Sant'ana et al., 2017). Entretanto, os nossos resultados demonstraram um efeito protetor ao eritrócito retardando a polimerização nas concentrações de 2,5 μM e 25 nM, fazendo com que demore mais tempo para a hemácia atingir o formato de foice. Com intuito de analisar o porquê de isso acontecer, outro integrante do nosso grupo de pesquisa realizou um experimento *in silico* onde foi possível observar interações do DEHP com a valina 6 que ocasionaria essa diminuição na polimerização. Em anexo constam algumas imagens via microscopia eletrônica que comprovam as interações obtidas nesse experimento.

Essa pesquisa surge com uma proposta inovadora de estudar o efeito do DEHP sob o sangue de pacientes falciformes a fim de observar seus efeitos, sendo um estudo pioneiro capaz de demonstrar a interferência do DEHP sob a polimerização da HbS. O benefício desses achados agrega a literatura científica, tendo em vista que não se encontra relatos sobre a atuação dos interferentes endócrinos na polimerização da DF.

7. CONCLUSÃO

A partir desse estudo pode-se concluir que o DEHP, interferente endócrino analisado presente nas bolsas de sangue, apresentou um efeito benéfico provocando um retardo na polimerização da HbS nas concentrações de 2,5 μM e 25 nM testadas in vitro, que pode amenizar os sintomas da AF em seus portadores (Figura 5). A perspectiva futura desse trabalho será investigar com maior amplitude o porquê dessa interação positiva, tendo em vista que o DEHP é muito debatido na literatura por seus efeitos nocivos.

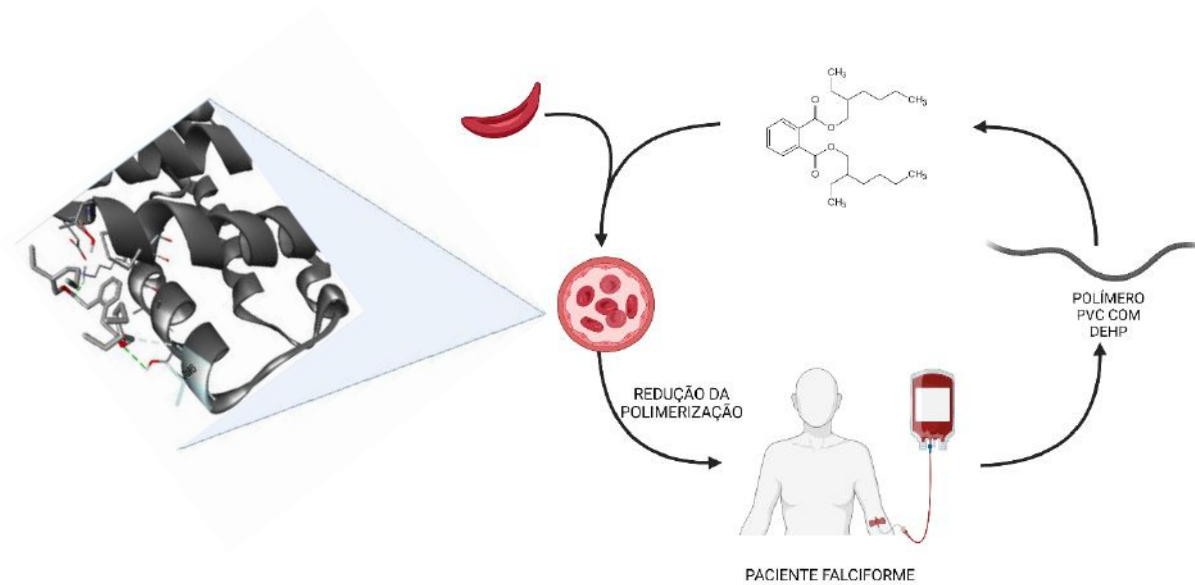


Figura 5: Ilustração geral do estudo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, J. L.; ALMEIDA N.A.; Santos P.S.; Oliveira P.P.; Lanza F.M. Perfil sociodemográfico, econômico e de saúde de adultos com doença falciforme. **Rev Rene**, v. 16, n. 3, 28 jun. 2015.

AMER, J.; FIBACH, E. Chronic oxidative stress reduces the respiratory burst response of neutrophils from beta-thalassaemia patients. **British Journal of Haematology**, v. 129, n. 3, p. 435–441, maio 2005.

ARDUINI, G. A. O.; RODRIGUES, L. P.; TROVÓ DE MARQUI, A. B. Mortality by sickle cell disease in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 1, p. 52–56, 1 jan. 2017.

BERNARD, L.; CUEFF, R.; BOURDEAUX, D.; BREYSSE, C.; SAUTOU, V. Analysis of plasticizers in poly(vinyl chloride) medical devices for infusion and artificial nutrition: comparison and optimization of the extraction procedures, a pre-migration test step. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 6, p. 1651–1659, fev. 2015.

BALLAS, S. K.; LIEFF, S.; BENJAMIN, L.J.; DAMPIER, C.D.; HEENEY, M.M.; HOPPE, C.; Johnson, C.S.; ROGERS, Z.R.; SMITH-WHITLEY, K.; WANG, W.C.; TELEN, M.J.; Definitions of the Phenotypic Manifestations of Sickle Cell Disease. **American journal of hematology**, v. 85, n. 1, p. 6–13, jan. 2010.

BATISTA, G. S; SANTOS N.A.; MARQUETTI V.B.; MOTA W.B.; SILVÉRIO A.S.D. Hemoglobinopatias: investigação em sangue periférico de acadêmicos de uma universidade de Alfenas - MG. **Revista de Medicina**, v. 99, n. 3, p. 246–250, 12 jun. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC/Anvisa nº 35, de 12 de junho de 2014. Dispõe sobre bolsas plásticas para coleta, armazenamento e transferência de sangue humano e seus componentes. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de jun. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde. Departamento de Gestão do Trabalho na Saúde. Técnico em hemoterapia: livro texto/Ministério da Saúde, Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação 69 na Saúde, **Departamento de Gestão da Educação na Saúde** – Brasília: Ministério da Saúde, 2013a. 292 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Caderno de informação: sangue e hemoderivados: dados de 2015/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, **Departamento de Atenção Especializada e Temática**. – 1. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017. 118 p. 2017b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Diretrizes nacionais para**

a vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017a.

BRASIL. **Resolução RDC/Anvisa nº 185, de 22 de outubro de 2001**. Aprova o Regulamento Técnico que consta no anexo desta Resolução, que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de out. 2001b.

BROUSSE, V.; Elie, C.; BENKERROU, M.; ODIÈVRE M.H.; LESPRIT, E.; BERNAUDIN, F.; GRIMAUD, M.; GUITTON, C.; QUINET, B.; DANGIOLO, S.; MONTALEMBERT, M. Acute splenic sequestration crisis in sickle cell disease: cohort study of 190 paediatric patients: Acute Splenic Sequestration Crisis in Sickle Cell Disease. **British Journal of Haematology**, v. 156, n. 5, p. 643–648, mar. 2012.

BUNN, H. F. Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 11, p. 762–769, 11 set. 1997.

CANÇADO, R. D. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 316–326, set. 2007.

CARVALHO, C. M. Avaliação de técnicas para análise de plastificantes em bolsas de sangue. **Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2018. Orientação: Kátia Christina Leandro, 2018.**

CAVALCANTI, J. M.; MAIO, M. C. Entre negros e miscigenados: a anemia e o traço falciforme no Brasil nas décadas de 1930 e 1940. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 18, p. 377–406, jun. 2011.

CERQUEIRA, B. A. V.; BOAS, W.V.; ZANETTE, A. A. D.; REIS, M.G.; GONÇALVES, M. S.; ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES LABORATORIAIS AO PERFIL CLÍNICO EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME DE SALVADOR- BAHIA. **Gazeta Médica da Bahia**, p. 5, 2010.

CHINELATO-FERNANDES, A. R.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Contribuição do estudo molecular de Hemoglobinas S-like para o conhecimento da diversidade genética da população brasileira. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 2005, v. 27, n. 3, p. 208-210.

CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; COSTA, F. F. Newer Aspects of the Pathophysiology of Sickle Cell Disease Vaso-Occlusion. **Hemoglobin**, v. 33, n. 1, p. 1–16, jan. 2009.

DAAK, A. A.; ELSAMANI, E.; ALI, E. H.; MOHAMED, F. A.; ABDEL-RAHMAN. M. E. ELDERDERY, A. Y.; TALBOT, O.; KRAFT, P.; GHEBREMESKEL, K.; ELBASHIR, M. I.; FAWZI, W. Sickle cell disease in western Sudan: genetic epidemiology and predictors of knowledge attitude and practices. **Tropical Medicine & International Health**, v. 21, n. 5, p. 642–653, maio 2016.

DE OLIVEIRA, S.; SALDANHA, C. An overview about erythrocyte membrane. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 44, n. 1, p. 63–74, 2010.

EATON, W. A.; BUNN, H. F. Treating sickle cell disease by targeting HbS polymerization. **Blood**, v. 129, n. 20, p. 2719–2726, 18 maio 2017.

ERYTHROPEL, H. C. et al. Leaching of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) from plastic containers and the question of human exposure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 9967–9981, dez. 2014.

FERRAZ, M. H. C.; MURAO, M. Diagnóstico laboratorial da doença falciforme em neonatos e após o sexto mês de vida. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, set. 2007.

FIGUEIREDO, R. O.; ALVES, A. DA S. Fases da meia lua: perfil nutricional de pacientes falcêmicos amazônidos / Phases of the half moon: nutritional profile of amazonian sickle cell patients. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 5, p. 36281–36294, 10 maio 2022.

GALIZA NETO, G. C. DE; PITOMBEIRA, M. DA S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 51–56, 2003.

GOMES, L. G. O.; FODRA, J. D.; MASSABNI, A.C.; Hematologia dos vertebrados: a série vermelha do sangue. **Revista Brasileira Multidisciplinar - ReBraM**, 23 fev. 2022.

HAISHIMA, Y.; KAWAKAMI, T.; HASEGAWA, C.; TANOUE, A.; YUBA, T.; ISAMA, K.; MATSUOKA, A.; NIIM, S. Screening study on hemolysis suppression effect of an alternative plasticizer for the development of a novel blood container made of polyvinyl chloride. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 102, n. 4, p. 721–728, maio 2014.

HAJJAR, L. A.; AULER JUNIOR J. O. C.; SANTOS L.; GALAS F. BLOOD TRANSFUSION IN CRITICALLY ILL PATIENTS: STATE OF THE ART. **Clinics**, v. 62, n. 4, p. 507–524, 1 ago. 2007.

HERITY, L. B.; VAUGHAN, D.M.; RODRIGUEZ, L. R.; LOWE, D. K.; Voxelotor: A Novel Treatment for Sickle Cell Disease. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 55, n. 2, p. 240–245, fev. 2021.

HOLSBACH, D. R.; SALAZAR, E. A. V. M.; IVO, M. L.; de ARAUJO, O. M. R.; SAKAMOTO, T. M. Investigação bibliográfica sobre a hemoglobina S de 1976 a 2007. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 23, n. 1, p. 119–124, 2010.

HOWARD, J.; OTENG-NTIM, E. The obstetric management of sickle cell disease. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 26, n. 1, p. 25–36, fev. 2012.

INOUE, K. et al. Evaluation and analysis of exposure levels of di(2-ethylhexyl) phthalate from blood bags. **Clinica Chimica Acta**, v. 358, n. 1, p. 159–166, 1 ago. 2005.

KATO, G. J.; PIEL, F. B.; REID, C. D.; GASTON, M. H.; OHENE-FREMPONG, K.; KRISHNAMURTI, L.; SMITH, W.R.; PANEPINTO, J. A.; WEATHERALL, D. J.;

COSTA, F. F.; VICHINSKY, E. P. Sickle cell disease. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 4, p. 18010, 15 mar. 2018.

LOZANO, M.; CID, J. DEHP plasticizer and blood bags: challenges ahead. **ISBT Science Series**, v. 8, n. 1, p. 127–130, 2013.

MACHADO, L. DE S. B.; GONÇALVES, M. J. P.; SILVA, F. L. M.; KURY, C. M. H. ASPECTOS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS DA ANEMIA FALCIFORME. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**, v. 16, n. 2, p. 79–88, 29 out. 2021.

MACHADO, L. P.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M. E.; SILVEIRA, V. F.; YONEZAWA, L. A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse na Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 84–94, 2009.

MACHADO, R. F. Hipertensão Pulmonar Associada à Anemia Falciforme. **Revista Pulmão RJ - SOPTERJ**, p. 8, 2015.

MAIOLI, M. C. P.; SOARES, A. R.; BEDIRIAN, R.; ALVES, U. D.; MARINHO, C. L.; LOPES, A. J. Relationship between pulmonary and cardiac abnormalities in sickle cell disease: implications for the management of patients. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, p. 21–27, fev. 2016.

MENDONÇA, A. C.; GARCIA, J. L.; ALMEIDA, C. M.; MEGID, T. B. C.; JÚNIOR, A. F. Muito além do “Teste do Pezinho”. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 88–93, abr. 2009.

MONTEIRO, A. C. B.; DORIGATTI, D. H.; RODRIGUES, A. G.; SILVA, J. B. M. ANEMIA FALCIFORME, UMA DOENÇA CARACTERIZADA PELA ALTERAÇÃO NO FORMATO DAS HEMÁCIAS. **Saúde em Foco**, p. 12, 2015.

MONTEIRO, M.; GOTARDO, M. A. Ftalato de di-(2-etilexila) (DEHP) em bolsas de PVC para soluções parenterais de grandes volumes. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, p. 9, 1 dez. 2005.

ODIÈVRE, M.-H. et al. Pathophysiological insights in sickle cell disease. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 134, n. 4, p. 532–537, out. 2011.

Olubiyi, O. O.; Olagunju, M. O.; Strodel, B. (2019). Rational Drug Design of Peptide-Based Therapies for Sickle Cell Disease. **Molecules**, 2019, 24, 4551.

PECKER, L. H.; LITTLE, J. Clinical Manifestations of Sickle Cell Disease Across the Lifespan. Em: MEIER, E. R.; ABRAHAM, A.; FASANO, R. M. (Eds.). **Sickle Cell Disease and Hematopoietic Stem Cell Transplantation**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 3–39.

PICCIN, A.; MURPHY, C.; EAKINS, E., RONDINELLI, M.B.; DAVES, M.; VECCHIATO, C; WOLF, D.; MAHON, C.M.; SMITH, O.P. Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anaemia and possible treatment. **European Journal of Haematology**, v. 102, n. 4, p. 319–330, abr. 2019.

PINTO, V. M.; BALOCCO, M.; QUINTINO, S.; FORNI, G. L. Sickle cell disease: a review for the internist. **Internal and Emergency Medicine**, v. 14, n. 7, p. 1051–1064, out. 2019.

PINTO, P. C. A.; BRAGA, J. A. P.; SANTOS, A. M. N. Fatores de risco para aloimunização em pacientes com anemia falciforme. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 57(6):668-673. 2011.

PROWSE, C. V.; de KORTE, D.; HESS, J. R.; VAN DER MEER, P. F. Commercially available blood storage containers. **Vox Sanguinis**, v. 106, n. 1, p. 1–13, 2014.

QUEIROZ, E, K, R. Occupational exposure to endocrine disruptors with effects on the male reproductive system. **Oswaldo Cruz Foundation**, Rio de Janeiro, 2015, p 16.

SALOMÃO, L. F. N. ET AL. CONDIÇÕES CLÍNICAS, DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME: UM ESTUDO TRANSVERSAL EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA DE GOIÁS. **Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Iniciação Científica do curso de medicina da Universidade Evangélica de Goiás – UniEVANGÉLICA**, Orientação: Profa. Ms. Marcela de Andrade Silvestre. p. 60, 2022.

SANT'ANA, P. G. DOS S.; ARAUJO, A. M.; PIMENTA, C. T.; BEZERRA, M. L. P. K.; JUNIOR, S. P. B.; NETO, V. M.; DIAS, J. S.; LOPES, A. F.; RIOS, D. R. A.; PINHEIRO, M. B. Clinical and laboratory profile of patients with sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 1, p. 40–45, 1 jan. 2017.

SANTIS, G. C. D. Anemia: definição, epidemiologia, fisiopatologia, classificação e tratamento. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 52, n. 3, p. 239–251, 7 nov. 2019.

SANTO, A. H. Sickle cell disease related mortality in Brazil, 2000–2018. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 44, n. 2, p. 177–185, abr. 2022.

SANTOS, J. L. DOS; CHIN, C. M. Anemia falciforme: desafios e avanços na busca de novos fármacos. **Química Nova**, v. 35, p. 783–790, 2012.

SARAMBA, M. I.; SHAKYA, S.; ZHAO, D. Analgesic management of uncomplicated acute sickle-cell pain crisis in pediatrics: a systematic review and meta-analysis. **Jornal de Pediatria**, v. 96, n. 2, p. 142–158, 24 jul. 2019.

SERRANO, K.; LEVIN, E.; CHEN, D.; HANSEN, A.; TURNER, T. R.; KURACH, J.; REIDEL, A.; BOECKER, W. F.; ACKER, J. P.; DEVINE, D. V. An investigation of red blood cell concentrate quality during storage in paediatric-sized polyvinylchloride bags plasticized with alternatives to di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP). **Vox Sanguinis**, v. 110, n. 3, p. 227–235, abr. 2016.

SOUZA, A. F. D. Caracterização molecular dos haplótipos ligados ao gene da globina β e investigação da deficiência da enzima g6pd em paciente com doença falciforme no estado da paraíba. **Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da**

Universidade Federal da Paraíba. Orientação: Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares. João Pessoa, p. 70, 2020.

SOUZA, J. M.; ROSA, P. E. L.; SOUZA, R. L.; CASTRO, G. F. P. Fisiopatologia da anemia falciforme. **Revista Transformar**, v. 8, n. 8, p. 162–178, 29 maio 2016.

STYPULKOWSKI, J. B.; MANFREDINI, V. Alterações hemostáticas em pacientes com doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 56–62, fev. 2010.

STEINBERG, M. H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **TheScientificWorldJournal**, v. 8, p. 1295–1324, 25 dez. 2008.

TISDALE, J. F.; THEIN, S. L.; EATON, W. A. Treating sickle cell anemia. **Science**, v. 367, n. 6483, p. 1198–1199, 13 mar. 2020.

TRUELAND, J. Rising to the sickle cell challenge: Nurses are helping to improve management of a serious genetic condition, says Jennifer Trueland. **Nursing Standard**, v. 28, n. 47, p. 22–23, 23 jul. 2014.

TZOUNAKAS, V. L. et al. Red cell transfusion in paediatric patients with thalassaemia and sickle cell disease: Current status, challenges and perspectives. **Transfusion and Apheresis Science: Official Journal of the World Apheresis Association: Official Journal of the European Society for Haemapheresis**, v. 57, n. 3, p. 347–357, jun. 2018.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 207–214, set. 2007.

ZÚÑIGA, P.; Martínez, C.; González, L. M.; Rendón, D. S.; Rojas, N.; Barriga, F.; Wietstruck, M. A.; Enfermedad de células falciformes: Un diagnóstico para tener presente. **Revista Chilena de Pediatría**, v. 89, n. 4, p. 525–529, 5 set. 2018.

9. APÊNDICE

9.1 Melhor Trabalho em Sessão de Apresentação do Campus Macaé na XLII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Tecnológica, Artística e Cultural (JITAC 2020 – Edição Especial)



9.2 Menção Honrosa na 11ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ



10. ANEXO

10.1 Ilustrações de outros experimentos do mesmo grupo de pesquisa que comprovam os resultados obtidos

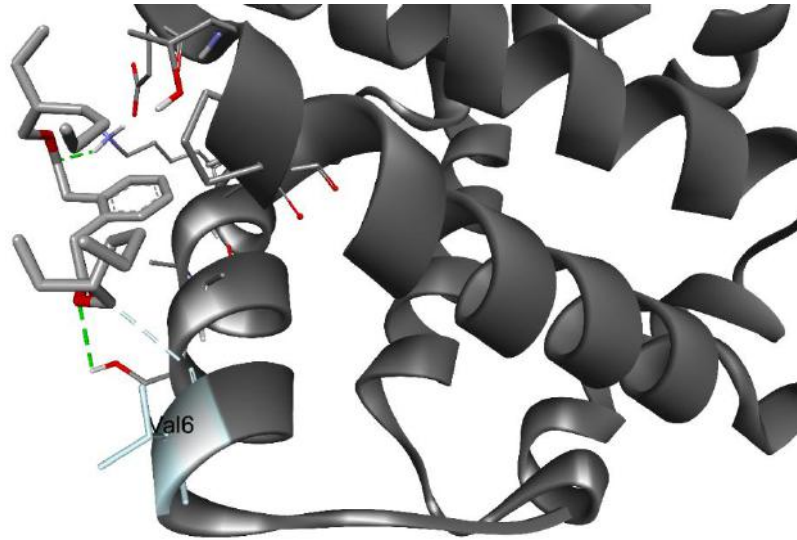


Figura 6: Ilustração da molécula de DEHP se associando a valina.

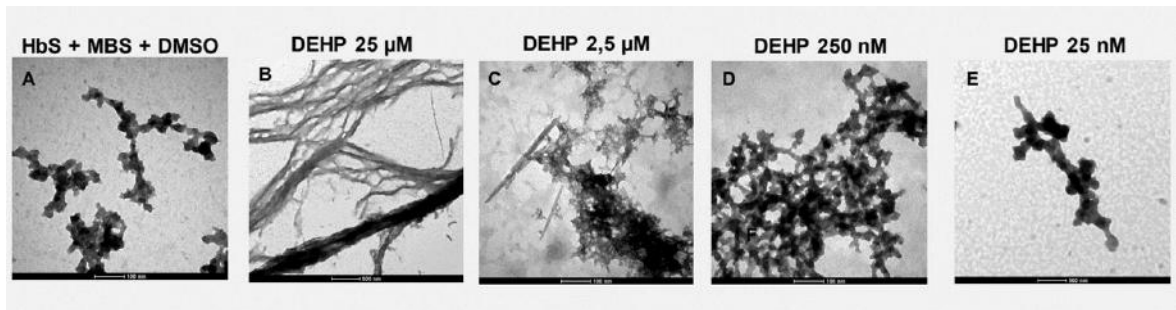


Figura 7: Imagens captadas via microscopia óptica demonstrando a interferência do DEHP na polimerização da HbS. (A) Proteína no controle de DMSO; (B) Fibras concentradas de proteína que provocam o aumento da polimerização; (c) (d) e (e) pequenos agregados de proteína pouco concentrado que retarda a polimerização.