



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MATHEUS TODT ARAGÃO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ÚLCERA FALCÊMICA, INFLAMAÇÃO
E HEMÓLISE**

**ARACAJU-SE
2022
MATHEUS TODT ARAGÃO**

ASSOCIAÇÃO ENTRE ÚLCERA FALCÊMICA, INFLAMAÇÃO E HEMÓLISE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. FRANCILENE
AMARAL DA SILVA

**ARACAJU-SE
2022**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE – BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

A659a Aragão, Matheus Todt
Associação entre úlcera falcêmica, inflamação e hemólise /
Matheus Todt Aragão ; orientadora Francilene Amaral da Silva. –
Aracaju, 2023.
66 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade
Federal de Sergipe, 2023.

1. Ciências da saúde. 2. Anemia falciforme. 3. Úlcera de perna.
4. Hemólise. 5. Inflamação. I. Silva, Francilene Amaral da, orient.
II. Título.

CDU 616.155.194

TÍTULO: Associação entre úlcera falcêmica, inflamação e hemólise.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Aproximadamente 5% da população mundial apresenta genes que codificam hemoglobinopatias, sendo estimado mais de 25 milhões de pessoas acometidas por anemia falciforme em todo o mundo. Entre esses pacientes, as complicações musculoesqueléticas são uma causa frequente de morbidade, sendo as úlceras falcêmicas as mais comuns, acometendo até 10% dos portadores da anemia falciforme. A etiopatogenia dessas úlceras é complexa, ainda não estando bem caracterizada. Diante da escassez de dados sobre o tema, propõe-se o estudo da associação entre hemólise, inflamação e úlceras falcêmicas. **METODOLOGIA:** Trata-se de um estudo transversal e analítico envolvendo pacientes com anemia falciforme e história de úlcera em pernas, sendo estes comparados a pacientes portadores de anemia falciforme sem lesão. Todos os pacientes envolvidos eram homozigóticos, sendo os grupos pareados quando idade, presença de comunidades e uso de medicações. Para evitar vieses relacionados à atividade da doença falciforme, foram excluídos pacientes com história recente de crise vasooclusiva, internamento hospitalar, hemotransfusão e doenças infecciosas ou inflamatórias. Foram avaliadas a ocorrência de úlceras, tempo de evolução, número de recidivas, marcadores de hemólise (hemoglobina, LDH e bilirrubina) e marcadores pro e anti-inflamatórios (IL-1b,6,8,10 e TNF-alfa). **RESULTADOS:** Não foi evidenciada correlação estatisticamente significativa entre níveis de marcadores de hemólise e de citocinas (pro-inflamatórias e anti-inflamatórias), o surgimento nem a evolução das úlceras falcêmicas. Sugere-se que tanto a hemólise quanto a inflamação exerçam papéis secundários em um mecanismo multifatorial complexo, não configurando condições imprescindíveis para a ocorrência das lesões. **CONCLUSÃO:** Propõem-se uma visão mais ampla da fisiopatogenia das úlceras cutâneas, dando-se maior ênfase a uma associação de fatores sistêmicos e locais, e menor relevância a marcadores laboratoriais.

PALAVRAS-CHAVE: Úlcera de perna; Anemia Falciforme; Hemólise; Inflamação

TITLE: Association between sickle cell leg ulcer, inflammation and hemolysis.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Approximately 5% of the world population has genes that encode hemoglobinopathies, and it is estimated that more than 25 million people are affected by sickle cell anemia worldwide. Among these patients, musculoskeletal complications are a frequent cause of morbidity, with sickle cell ulcers being the most common, affecting up to 10% of patients with sickle cell anemia. The etiopathogenesis of these ulcers is complex, not being fully characterized yet. Given the scarcity of data on the subject, it is proposed to study the association between hemolysis, inflammation and sickle cell ulcers. **METHODOLOGY:** This is a cross-sectional and analytical study involving patients with sickle cell anemia and a history of leg ulcers, which were compared to patients with sickle cell anemia without lesions. All patients involved were homozygous, and the groups were matched for age, presence of comorbidities and medication use. To avoid biases related to sickle cell disease activity, patients with a recent history of vasoocclusive crisis, hospital admission, blood transfusion and infectious or inflammatory diseases were excluded. The occurrence of ulcers, time of evolution, number of recurrences, hemolysis markers (hemoglobin, LDH and bilirubin) and pro and anti-inflammatory markers (IL-1b,6,8,10 and TNF-alpha) were evaluated. **RESULTS:** There was no statistically significant correlation between levels of hemolysis markers and cytokines (pro-inflammatory and anti-inflammatory), the emergence or evolution of sickle cell ulcers. It is suggested that both hemolysis and inflammation play secondary roles in a complex multifactorial mechanism, not configuring essential conditions for the occurrence of lesions. **CONCLUSION:** A broader view of the pathophysiology of skin ulcers is proposed, giving greater emphasis to an association of systemic and local factors, and less relevance to laboratory markers.

KEY WORDS: Leg Ulcer; Sickle Cell Anemia; Hemolysis; Inflammation

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------------------|-----------|
| INTRODUÇÃO | 6 |
| OBJETIVOS | 8 |
| OBJETIVO GERAL | 8 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 8 |
| REVISÃO DA LITERATURA | 9 |
| A DOENÇA FALCIFORME | 9 |
| CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO DA DOENÇA FALCIFORME | 11 |
| A ÚLCERA FALCÊMICA | 12 |
| ÚLCERA FALCÊMICA E HEMÓLISE | 16 |
| ÚLCERA FALCÊMICA E INFLAMAÇÃO | 18 |
| ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS DAS ÚLCERAS FALCÊMICAS | 19 |
| METODOLOGIA | 22 |
| DELINEAMENTO METODOLÓGICO | 22 |
| AMOSTRA | 22 |
| CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO | 22 |
| VARIÁVEIS E COLETA DE DADOS | 23 |
| ANÁLISE DOS RESULTADOS | 24 |
| ASPECTOS ÉTICOS | 24 |
| RESULTADOS | 25 |
| DISCUSSÃO | 33 |
| CONCLUSÃO | 37 |
| FRAGILIDADES DO ESTUDO | 37 |

| | |
|---------------------------------------------------|-----------|
| IMPLICAÇÕES | 37 |
| REFERÊNCIAS | 38 |
| APÊNDICES | 44 |
| TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO | 44 |
| ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO | 45 |

INTRODUÇÃO

Aproximadamente 5% da população mundial apresenta genes que codificam hemoglobinopatias, sobretudo a anemia falciforme e a talassemia (OMS, 2011). A doença falciforme é uma das principais causas de doença monogênica, sendo estimados mais de 25 milhões de pessoas acometidas em todo o mundo (REES, 2010). No Brasil, 2-8% da população apresenta a forma heterozigótica simples (o “traço falcêmico”), 25.000-50.000 pessoas possuem a doença homozigótica ou a condição heterozigótica composta, sendo estimada uma média de 3.500 nascidos com a doença e 200.000 novos portadores do “traço falcêmico” por ano (SAÚDE, 2009).

O quadro clínico da anemia falciforme é caracterizado por complicações agudas, como crise algica e síndrome torácica aguda, e complicações crônicas como úlceras de perna e hipertensão pulmonar (ONYEMAECHI, 2011). As complicações musculoesqueléticas são uma causa frequente de morbidade, sendo as úlceras de perna (úlceras falcêmicas) uma das mais comuns (ONYEMAECHI, 2011). Estima-se que 8-10% dos portadores da forma homozigótica apresentem úlceras em membros inferiores (PALADINO, 2007). Apesar da prevalência elevada, essas úlceras são frequentemente subdiagnosticadas e, conseqüentemente, tratada de forma inadequada,

A etiologia das úlceras falcêmicas é multifatorial e complexa, não estando completamente caracterizada (MOHAN, 1997; DE CARVALHO-SIQUEIRA). Dados sobre patogênese e fatores de risco são frequentemente contraditórios (HALABITAWIL, 2008). Atualmente, a fisiopatogenia proposta para as úlceras falcêmicas inclui diversos fatores como: obstrução mecânica pelas hemácias afoiçadas, reticulócitos, plaquetas e leucócitos; trombose *in situ*; insuficiência venosa; infecções bacterianas; desregulação autonômica com vasoconstricção excessiva; anemia; deficiência de antitrombina III; redução na biodisponibilidade e aumento do consumo do óxido nítrico endotelial; inflamação (MOHANDAS, 1985; MOHAN, 1997; MACKIS, 2000; MACK, 2006; PALADINO, 2007; LANARO, 2009; MINNITI, 2010; BOWERS, 2020).

As úlceras de pernas em pacientes com anemia falciforme tendem a ser indolentes, debilitantes, de difícil tratamento e de cicatrização lenta (BALLAS, 2002;

MINNITI, 2016). Apesar da baixa mortalidade, interferem bastante na vida dos pacientes, incluindo em aspectos socioeconômicos (CLARE, 2002).

A maioria dos aspectos envolvendo a anemia falciforme já foi extensivamente estudada, embora ainda existam muitas questões não respondidas acerca das úlceras falcêmias, sendo estudos acerca do assunto ainda inconclusivos (SERJEANT, 2005). O conhecimento das variáveis relacionadas à essas úlceras pode levar a uma melhor compreensão de sua etiologia, contribuindo com a prevenção e tratamento (CARVALHO-SIQUEIRA, 2019). Diante da heterogeneidade dos dados sobre a patogenia das úlceras de pernas em portadores de anemia falciforme, e diante da relevância dessas lesões na sobrevida dos pacientes, propõe-se o estudo de fatores potencialmente relacionados à enfermidade: a hemólise e a inflamação.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Analisar a associação entre marcadores de hemólise e de inflamação, e o surgimento e a cicatrização das úlceras cutâneas associadas à anemia falciforme.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Observar características clínicas e epidemiológicas das úlceras cutâneas associadas à anemia falciforme;
- II. Comparar marcadores de hemólise entre pacientes com úlcera falcêmica e pacientes com anemia falciforme sem úlcera;
- III. Comparar marcadores inflamatórios entre pacientes com úlcera falcêmica e pacientes com anemia falciforme sem úlceras.

REVISÃO DA LITERATURA

A DOENÇA FALCIFORME

Aproximadamente 5% da população mundial apresenta genes que codificam hemoglobinopatias, sobretudo a anemia falciforme e a talassemia (OMS, 2011). As hemoglobinopatias representam um problema significativo de saúde em 71% dos 229 países do globo, com cerca de 300.000 crianças acometidas a cada ano, 83% delas por anemia falciforme. A doença falciforme é uma das principais causas de doença monogênica, sendo estimado mais de 25 milhões de pessoas acometidas em todo o mundo (REES, 2010). O número preciso de indivíduos afetados pela doença no mundo é desconhecido e não pode ser estimado de forma confiável devido à falta de dados epidemiológicos, particularmente, em áreas de alta prevalência (KATO, 2018).

O reconhecimento de que a anemia falciforme é uma doença prevalente no Brasil foi determinante na instituição da Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme (PNAIPDF) do Ministério da Saúde. No país, 2-8% da população apresenta a forma heterozigótica simples (o “traço falcêmico”), 25.000-50.000 pessoas possuem a doença homozigótica (SS) ou a condição heterozigótica composta (SC, SE, SD e SBetaTAL), sendo estimada uma média de 3.500 nascidos com a doença e 200.000 novos portadores do “traço falcêmico” por ano (SAÚDE, 2009).

As doenças falciformes constituem um grupo de hemoglobinopatias hereditárias que cursam com anemia hemolítica crônica, vasculopatia, fenômenos vasoclusivos e lesões orgânicas. Elas se caracterizam pela presença em homozigose (SS) ou heterozigose (SC) da hemoglobina S, resultado de uma mutação no sexto códon do gene da betaglobina (cromossomo 11), resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina. A hemoglobina S apresenta menor solubilidade no estado desoxigenado, fazendo as moléculas se polimerizarem. O polímero distorce o eritrócito, conferindo um aspecto “em foice”, sendo apenas com a reoxigenação que os polímeros se desfazem e a célula reassume seu formato original. Os diversos ciclos de falcização e desfalcização levam à alterações permanentes da membrana eritrocitária, tor-

nando a célula irreversivelmente deformada, interferindo em sua adesividade e levando-a a hemólise precoce pelo sistema reticuloendotelial (PALADINO, 2007; KATO, 2009).

O quadro clínico da doença falciforme é caracterizado por complicações agudas e crônicas. Os eventos agudos são representados pela crise álgica, síndrome torácica aguda, acidente vascular encefálico, crise aplástica, sequestro esplênico e priapismo. As principais complicações crônicas são as úlceras em membros inferiores, a colecistopatia crônica calculosa, a insuficiência renal, a hipertensão pulmonar, a *cor pulmonale*, a necrose isquêmica da cabeça do fêmur, a osteomielite e a retinopatia (ONYEMAECHI, 2011).

O protótipo das complicações relacionadas à doença falciforme são as crises vaso-oclusivas. Essa vaso-oclusão é um fenômeno complexo que resulta da interação de diversas células, como eritrócitos, células endoteliais, leucócitos e plaquetas. A polimerização da hemoglobina S altera o formato dos eritrócitos, resultando em hemólise e bloqueio do fluxo sanguíneo, sobretudo de pequenos vasos. O aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial, como a Proteína 1 de Adesão Celular Vascular (ICAM-1), a Molécula 1 de Adesão Celular Vascular (VCAM-1), a P-Selectina, a E-selectina, os antígenos de superfície leucocítica CD47 e a $\alpha V\beta 3$ -Integrina, é responsável pela adesão de eritrócitos e leucócitos. Além disso, o grupo Heme da hemoglobina ativa o sistema imune inato, aumentando a adesividade das células circulantes ao endotélio, contribuindo assim com a vaso-oclusão. O Heme também estimula os neutrófilos a secretarem Armadilhas Extracelulares dos Neutrófilos (NETs) que, por sua vez, aumentam a ativação plaquetária, resultando na liberação de Fatores de Crescimento Plaquetário (PDGF) e de Endoleína-1 (ET-1), um potente vasoconstrictor (KATO, 2018).

Na anemia falciforme, receptores de reconhecimento de padrão Toll-like 4 (TLR-4) são altamente expressados, o que termina por ativar monócitos e macrófagos a liberarem citocinas inflamatórias, aumentando ainda mais a adesividade de neutrófilos, plaquetas e células endoteliais. A ativação das células endoteliais libera mediadores inflamatórios, como interleucina 1 beta (IL-1b), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF), levando a um estado inflamatório crônico (KATO, 2018).

CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO DA DOENÇA FALCIFORME

A anemia falciforme é vista como um problema de saúde pública em todo o mundo, levando em conta sua cronicidade e elevada taxa de morbimortalidade. O continente africano é de onde a doença se originou e foi difundida graças a grande quantidade de imigrantes escravos (MANFREDINI, 2007).

A doença falciforme está ligada à descendência de populações originárias principalmente da África Subsaariana, Índia, Arábia Saudita e de países mediterrâneos. Atualmente, encontra-se presente em grande parte da população mundial, sendo muito frequente nas populações do continente africano, principalmente nas regiões equatoriais e subsaarianas. A prevalência da doença pode chegar a 25% da população em algumas regiões, como ao redor dos rios Gâmbia e Senegal. Conforme dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), do Banco Mundial e da Ghana Sickle Cells Foundation, estima-se que na África nasçam cerca de 500.000 crianças por ano com anemia falciforme.

O Brasil, devido a sua grande população afrodescendente, possui 0,1-0,3% da população vivendo com anemia falciforme (FELIX, 2010). Segundo o Ministério da Saúde (MS), o número de acometidos pode chegar a 30.000, sendo que algumas estimativas mostram que esse número pode aumentar em até 3.500 novos casos ao ano (HOKAZONO, 2011). As regiões do país com maior prevalência da doença são a norte e a nordeste, presumivelmente por terem grande influência da raça negra em sua população (DUCATTII, 2001). Mais especificamente no nordeste, a prevalência do gene que codificada a doença é de cerca de 3%, alcançando 5,5% no estado da Bahia (GUIMARÃES, 2009).

A prevalência do alelo βS no Brasil é muito variável, chegando a variar de 1,2-10,9% a depender da região do país analisada (LERVOLINO, 2011; BRASIL, 2014; LOBO, 2014; SILVA, 2016). De acordo com a ANVISA, estima-se que no Brasil 7.200.000 pessoas sejam portadoras do “traço falcêmico” e 25.000-30.000 apresentem anemia falciforme (ANVISA, 2002).

A incidência de doença falciforme em recém nascidos varia substancialmente entre os estados brasileiros, refletindo em parte a heterogeneidade étnica da população. Segundo o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) do Ministério da Saúde, nascem por ano 3.500 crianças com anemia falciforme e 200.000 com traço falcêmico.

No estado de Sergipe, apesar de estar localizado em uma região de alta prevalência, dados epidemiológicos sobre a doença são escassos. Segundo Vivas e colaboradores, a incidência do traço falcêmico no estado é de 2,7%, sendo de 4,1% na capital Aracaju (VIVAS, 2006). Leite e colaboradores, em estudo publicado em 2020, analisaram 32.906 exames de triagem neonatal no estado de Sergipe, observando-se 1.202 casos de alteração do padrão da hemoglobina, sendo os municípios mais acometidos Aracaju (22,7%), Nossa Senhora do Socorro (8,4%), Estância (5,3%) e São Cristovão (4,8%).

Ainda hoje é evidente a escassez e desatualização dos dados a respeito da anemia falciforme no país. A inexistência de informações nos atestados de óbito, a ausência de cadastros informatizados nos centros de referência e a existência de um número significativo de pacientes ainda sem diagnóstico revelam a necessidade de uma melhor estruturação da rede de informação.

Ainda que não se trate de enfermidade transmissível, infecciosa ou parasitária, a doença falciforme se aproxima da situação das doenças negligenciadas, assumidas como aquelas com maior prevalência em populações de baixa renda e expostas às iniquidades, e que, embora possam existir financiamentos públicos específicos para indução das pesquisas, o conhecimento produzido não tem se revertido, proporcionalmente, em avanços terapêuticos, justificado, em parte, pelo baixo interesse das indústrias farmacêuticas (ROBERTI, 2010). Tratando-se de uma doença crônica e levando-se em consideração que a medida da qualidade de vida pode influenciar diretamente no prognóstico da doença, a anemia falciforme pode ser considerada um problema de saúde pública. Esse cenário revela a necessidade de estudos acerca de estratégias para implementar programas de saúde e privilegiar ações de cuidado às pessoas com a doença (ROBERTI, 2010).

A ÚLCERA FALCÊMICA

As complicações musculoesqueléticas são uma causa frequente de morbidade nos portadores de anemia falciforme, sendo as úlceras de perna (úlceras falcêmicas) uma das formas mais comuns (ONYEMAECHI, 2011). Segundo Isa e colaboradores, a úlcera falcêmica representa uma das complicações crônicas mais frequentes da anemia falciforme, atingindo 6,5% de todos os pacientes (ISA, 2020). Estima-se que 8-10% dos portadores da forma homozigótica da anemia falciforme apresen-

tem úlceras em membros inferiores (PALADINO, 2007). Nos Estados Unidos, estima-se que 14-18% dos pacientes com anemia falciforme desenvolverão úlceras em algum momento de sua vida, com 1-5% dos pacientes apresentando úlceras ativas (MINNITI, 2016). No entanto, a verdadeira prevalência das úlceras falcêmicas provavelmente é subestimada devido ao número limitado de registros e de estudos prospectivos acerca do tema (MINNITI, 2016).

A ocorrência da úlcera falcêmica é pouco frequente em menores de 10 anos de idade, geralmente ocorrendo entre 10 e 25 anos, e tornando-se infrequente após 30 anos (SERJEANT, 2005). São mais comuns em pacientes homozigóticos, com uma menor incidência em pacientes que apresentam níveis elevados de hemoglobina fetal (SERJEANT, 2005; PALADINO, 2007). A variação quanto ao sexo permanece incerta, com alguns estudos indicando maior prevalência entre homens (KOSHY, 1989; ANKRA-BADU, 1992; PALADINO, 2007; BAZUAYE, 2010) e outros não relatando variação entre os sexos (ADEDEJI, 1987). As úlceras ocorrem frequentemente em áreas de tecido adiposo escasso, pele fina e menor suprimento sanguíneo (MINNITI, 2010), tipicamente nas regiões maleolares (SERJEANT, 2005). A maioria das lesões têm diâmetro menor que 10cm, limites bem definidos, bordas levemente elevadas, com tecido de granulação em sua base, exsudato fibrinoso, sendo compostas por uma única lesão ou por várias lesões confluentes (SERJEANT, 2005). Uma característica importante da úlcera é a dor, que costuma ser mais intensa que em úlceras de outras etiologias (SERJEANT, 2005; PALADINO, 2007; MINNITI, 2010).



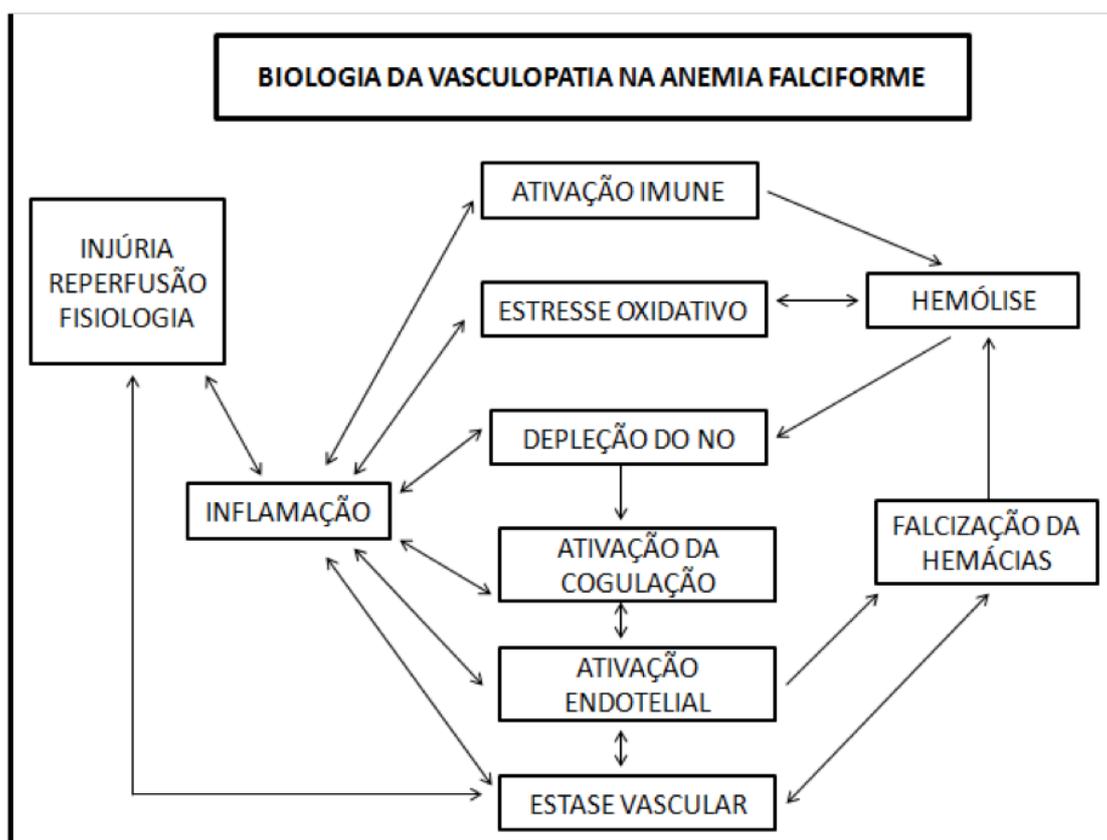
Figura: Aspecto típico de uma úlcera falcêmica.

Adaptado de: Granja PDet al: Leg ulcers in sickle cell disease patients. *J Vasc Bras.*, 2020.

Senet e colaboradores, em estudo observacional prospectivo em 2 dois centros franceses de referência entre 2009 e 2015, acompanharam 98 pacientes com úlceras falcêmicas. Foi observado que área da lesão menor que 8cm², duração menor 9 semanas e hemoglobina fetal elevada estavam estatisticamente associadas à cicatrização da úlcera em até 24 semanas. Os autores concluíram que a cicatrização das úlceras associadas à anemia falciforme estava mais associada à características da úlcera do que à características clínicas e biológicas da doença falcêmica (SENET, 2017).

A etiologia e fisiopatologia das úlceras falcêmicas é multifatorial e complexa, não estando completamente caracterizada e ainda suscitando muitas dúvidas (MOHAN, 1997). Dados sobre patogênese e fatores de risco são escassos e frequentemente contraditórios (HALABI-TAWIL, 2008). Atualmente, a fisiopatogenia proposta para as úlceras falcêmicas inclui os seguintes fatores: obstrução mecânica pelas hemácias afoiçadas, reticulócitos, plaquetas e leucócitos; trombose *in situ*; in-

suficiência venosa; infecções bacterianas; desregulação autonômica com vasoconstricção excessiva; anemia; deficiência de antitrombina III; redução na biodisponibilidade e aumento do consumo do óxido nítrico endotelial; inflamação (MOHANDAS, 1985; MOHAN, 1997; MACKIS, 2000; MACK, 2006; PALADINO, 2007; LANARO, 2009; MINNITI, 2010; BOWERS, 2020).



*Óxido Nítrico (NO)

Adaptado de: Kato GJ et al: Vasculopathy in sickle cell disease: biology, pathophysiology, genetics, translational medicine and new research directions. *Am J Hematol.*, 2009.

Nadiaye e colaboradores conduziram um estudo retrospectivo multicêntrico de 5 anos em Dakar, identificando, entre portadores de úlcera crônica em pernas, 40 casos de úlceras associadas à doença falciforme, correspondendo à 3,4% dos portadores de anemia falciforme na região estudada. Foi observada uma idade média de 25,9 anos, sendo 39 casos de doença homozigótica. O tempo de médio de evolução das lesões foi de 5,4 anos, com presença de apenas uma úlcera em 76%, re-

lato de dor 22 casos (48%), sendo o maléolo medial (39%) o local mais frequente de lesão (NADIAYE, 2016).

As úlceras de pernas em pacientes com anemia falciforme tendem a ser indolentes, debilitantes, de difícil tratamento e de cicatrização lenta (BALLAS, 2002; MINNITI, 2016). Apesar da baixa mortalidade, interferem bastante na vida dos pacientes, incluindo em aspectos socioeconômicos (CLARE, 2002). O tratamento das úlceras falcêmicas é insatisfatório e os estudos acerca do assunto são escassos (SERJEANT, 2005). As principais medidas terapêuticas incluem educação do paciente, limpeza local, desbridamento, curativos adequados e compressão (SERJEANT, 2005; MINNITI, 2010; LADIZINSKI, 2012). As transfusões sanguíneas, o uso sistêmico de Hidroxiuréia e Zinco, a aplicação de bota de Unna, os desbridamentos e os enxertos são as modalidades de tratamento mais utilizadas (SERJEANT, 2005; MINNITI, 2010). A antibioticoterapia sistêmica pode ser necessária na evidência de infecção, porém o papel da terapia antimicrobiana no tratamento dessas lesões ainda é obscuro (SERJEANT, 2005; LADIZINSKI, 2012). São poucos os ensaios clínicos controlados comprovando a eficácia dos diferentes tratamentos descritos na literatura (MINNITI, 2010).

ÚLCERA FALCÊMICA E HEMÓLISE

Apesar da causa exata da ocorrência das úlceras falcêmicas ainda ser desconhecida, alguns estudos apontam o papel da hemólise. Nolan e colaboradores observaram que pacientes com anemia falciforme e úlcera em pernas apresentam níveis mais baixos de hemoglobina, e níveis mais elevados de desidrogenase láctica (DHL), bilirrubina, transaminases e reticulócitos que os pacientes que não apresentam lesões (NOLAN, 2006). De forma semanalmente, Taylor e colaboradores, evidenciaram uma maior frequência de úlceras em pernas entre os indivíduos com DHL mais elevado no banco de dados Cooperative Study of Sickle Cell Disease (CSSD) (TAYLOR, 2008). Já Cumming e colaboradores reportaram DHL elevada, insuficiência venosa e baixo nível sócio econômico como preditores de úlceras crônicas em pacientes com anemia falciforme (CUMMING, 2008).

Mais recentemente, Connes e colaboradores, analisaram 13 pacientes com história de anemia falciforme e úlceras recorrentes em pernas, mas sem lesão ativa no período do estudo, comparando-os com pacientes com anemia falciforme sem

antecedente de lesões. No intuito de reduzir fatores de confusão, os autores excluíram pacientes com hemotransfusões nos 3 meses anteriores e aqueles que apresentaram vaso-oclusão há menos de 2 meses. Foram observados níveis de DHL aumentados nos pacientes com histórico de úlceras, porém a agregação de eritrócitos e viscosidade sanguínea calculadas não diferiu entre os grupos. O estudo concluiu que uma os pacientes com úlcera falcêmica apresentavam uma hemólise aumentada, no entanto, questionaram o papel da viscosidade sanguínea na sua fisiopatologia (CONNES, 2013).

A participação da hemólise e dos distúrbios endoteliais na fisiopatologia das úlceras falcêmicas vem sendo questionada. Nolan e colaboradores estudaram as características clínico-epidemiológicas das úlceras falcêmicas e a relação destas lesões com a intensidade da hemólise. O estudo envolveu 23 centros norte-americanos, analisados de 1978 a 1998, sendo avaliados 387 pacientes portadores de anemia falciforme com história de úlcera em pernas. Os autores observaram que os pacientes com úlcera apresentavam hemólise mais grave, níveis de reticulócitos, desidrogenase láctica (DHL), bilirrubinas e aspartato aminotransferase (AST) mais elevados que o controle, bem como índices menores de hemoglobina fetal (HbF). O estudo observou que a intensidade da hemólise provavelmente determina a ocorrência da complicação devido à redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), correlacionando as úlceras de perna a outras complicações da anemia falciforme como o acidente vascular encefálico, a hipertensão pulmonar e o priapismo (NOLAN, 2006).

Em uma coorte envolvendo 18 pacientes com anemia falciforme e úlceras em pernas, Minitti e colaboradores observaram que os indivíduos com úlcera falcêmica apresentavam hemólise mais intensa, incluindo baixa hemoglobina total, níveis de reticulócitos, bilirrubinas e AST mais elevados e, sobretudo, DHL mais elevada que os pacientes com anemia falciforme sem úlcera. Os autores salientaram que DHL aparentemente seria um bom preditor de síndrome hemolítica associada a disfunção endotelial, um subfenótipo da anemia falciforme que incluiria as úlceras falcêmicas (MINNITI, 2014).

Em uma coorte envolvendo 659 pacientes com anemia falciforme, Antwi-Boasiako e colaboradores avaliaram a distribuição geográfica e os fatores de riscos associados às úlceras falcêmicas. Foi observada uma prevalência de 10,3% de úlceras, estando as lesões associadas à idade elevada, ao genótipo SS, ao sexo mascu-

lino e à origem em Ghana. Foi evidenciado também uma associação entre úlceras de perda e marcadores de hemólise (hemoglobina mais baixa e bilirrubina total mais elevada) (ANTWI-BOASIAKO, 2020).

Em estudo transversal realizado a partir da coorte CADRE, envolvendo pacientes com anemia falciforme procedentes de países da África Subsaariana, foi analisada a associação entre hemólise e complicações vasculares. Após ajuste para sexo, idade, país e fenótipo da anemia falciforme, foi observado que níveis baixos de hemoglobina estavam significativamente associados à úlceras em pernas (DUBERT, 2017).

Olatunya e colaboradores sugeriram que a hemólise poderia ter um papel importante na fisiopatogenia da úlcera de perna, porém os autores salientaram que a hemólise intravascular talvez não seja suficiente para explicar o surgimento dessas lesões (OLATUNYA, 2019).

ÚLCERA FALCÊMICA E INFLAMAÇÃO

O estado inflamatório crônico próprio da doença falciforme pode levar a uma maior adesividade entre as células circulantes e o endotélio vascular. Marcadores inflamatórios e de adesão celular como o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-alfa), a Interleucina 1 Beta (IL-1b), Interleucina 10 (IL-10) e a Molécula de Adesão Intercelular 1 (ICAM-1) podem estar associados às úlceras de perna em paciente com anemia falciforme. O envolvimento de citocinas pro-inflamatórias, como IL-1b e TNF-alfa, em promover adesividade endotelial, ativação leucocitária e da cascata de coagulação podem representar potentes mediadores para episódios de vasclusão levando às úlceras crônicas em membros inferiores.

A associação entre inflamação e úlcera falcêmica vem sendo questionada na literatura. Bowers e colaboradores, ao avaliar 24 pacientes com doença falciforme e úlcera, propuseram que IL-1b, IL-10 e TNF-alfa possam estar associados às úlceras de pernas em pacientes com anemia falciforme. Porém, o próprio autor ressalta que a real associação desses marcadores inflamatórios com as lesões ainda não está clara (BOWERS, 2013).

Em estudo realizado por Da Silva e colaboradores, foi observado, em pacientes com úlceras falcêmicas, níveis elevados de Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 17A (IL-17A) e Interleucina 22 (IL-22), bem como níveis elevados de desidrogenase láctica

(DHL) (DA SILVA, 2014). Domingos e colaboradores enfatizaram o papel da inflamação na fisiopatologia da anemia falciforme, demonstrando a associação entre os níveis de Interleucina 8 (IL-8) e a ocorrência de úlceras (DOMINGOS, 2020). Rego e colaboradores avaliaram os níveis da citocina anti-inflamatória Interleucina 10 (IL-10) em portadores de úlcera falcêmica, evidenciando níveis mais elevados de IL-10 nesses pacientes (REGO, 2015).

Carvalho-Siqueira e colaboradores estudaram o DNA de pacientes com anemia falciforme em uma coorte incluindo 20 pacientes com anemia e úlceras crônicas em pernas e 20 pacientes sem lesão. Os autores identificaram associações entre variações do gene FLG2 e a ocorrência de úlceras em pernas, relacionando-as ao comprometimento da barreira cutânea predispondo à inflamação e infecção (CARVALHO-SIQUEIRA, 2019).

Mais recentemente, Belisário e colaboradores reportaram que pacientes com úlceras em pernas apresentam níveis significativamente mais elevados de IL-8, IL-10 e IL-15, quando comparados à pacientes com anemia falciforme sem úlceras (BELISÁRIO, 2022).

ASPECTOS SÓCIO-ECONÔMICOS DAS ÚLCERAS FALCÊMICAS

As úlceras falcêmicas são a complicação cutânea mais comum da doença falciforme, podendo ser uma condição crônica e debilitante, que compromete a qualidade de vida do paciente (MINNITI, 2010). A saúde de indivíduos vivendo com essas lesões não é influenciada apenas por manifestações como dor, mas também por fatores psicossociais. Essas úlceras vêm sendo estudadas sob a ótica clínica, porém poucos são os estudos que investigam fatores psicossociais e seu impacto na qualidade de vida (UMEH, 2017).

Briggs e Flemming conduziram um estudo compilando os principais achados de várias publicações que exploraram a experiência de “viver com uma úlcera crônica nas pernas”. Os autores identificaram temas recorrentes abordado pelos pacientes, como impactos físicos das lesões, a “jornada” da lesão, a relação com a equipe de saúde, impacto psicossocial e o custo relacionado ao tratamento (BRIGGS, 2007).

Já Umeh e colaboradores estudaram 20 portadores de úlceras relacionadas à anemia falciforme, sendo as questões mais abordadas pelos pacientes dor, comprometimento da condição física, isolamento social, comprometimento das relações

sociais e espiritualidade (UMEH, 2017). Os pacientes podem se encontrar debilitados e incapacitados devido à presença da úlcera, que tem como característica ser dolorosa, de difícil cicatrização, com evolução arrastada por meses e até anos (EL KHATIB, 2016). Embora 75-80% dos pacientes consigam se curar, em alguns pacientes, as úlceras persistem por mais de 20 anos e nunca cicatrizam. Depois da cura, podem ocorrer recidivas que se repetem entre 6-12 meses, sendo que este padrão de recorrência pode perdurar por muitos anos (MINNITI, 2016).

Ao estudar os déficits de autocuidado em mulheres com úlceras falcêmicas, Lacerda e colaboradores encontraram déficits mais relevantes relacionados à sociabilidade prejudicada, ingestão alimentar insuficiente, comprometimento da mobilidade e vacinação desatualizado (LACERDA, 2019).

Os custos do tratamento das úlceras falcêmicas estão diretamente relacionados ao tipo de cobertura utilizada, ao período de uso, à frequência de troca, ao tempo de cicatrização da ferida, à utilização de terapias adjuvantes e ao tipo de profissional responsável pelo tratamento (NUSSBAUM, 2018). Recentemente, Spira e colaboradores analisaram o custo médio para a completa cicatrização de uma úlcera por doença falciforme, sendo de R\$ 1.288,06 para uma lesão com área média de 14,95cm² (SPIRA, 2020).

A associação entre a alta prevalência da anemia falciforme em afrodescendentes com sua história de exclusão social, fruto da herança do regime escravocrata e sua posterior abolição sem contemplá-los com políticas de inclusão social, contribui para agravar o problema, pois determina a esses grupos até hoje, as piores condições de moradia, educação e saúde (RAMALHO, 2008).

Quanto às características sociais, Felix e colaboradores, ao avaliar 47 pacientes falcêmicos da cidade de Uberaba, com idade igual ou superior a 18 anos, observaram 78,7% negros, 17% pardos e 4,3% brancos. A maioria (74,5%) residia em bairros periféricos, 42,5% tinham o segundo grau completo, 38,2% eram aposentados ou não tinham profissão definida. A renda per capita de 48,9% era de até um salário mínimo e 19,1% não recebiam qualquer rendimento (FELIX, 2010).

METODOLOGIA

DELINEAMENTO METODOLÓGICO

Trata-se de um estudo transversal envolvendo pacientes com anemia falciforme e história de úlcera em pernas, sendo estes comparados a pacientes portadores de anemia falciforme sem lesões.

AMOSTRA

Foi utilizada uma amostra consecutiva e de conveniência, composta por pacientes cadastrados no ambulatório de hematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HU/UFS), um centro de referência regional. Com objetivo de evitar uma amostra muito limitada, já que não foi possível a utilização de uma amostra calculada, foi utilizado um número de pacientes equivalente aos principais estudos revisados (CONNES, 2013 ; BOWERS, 2013; MINNITI, 2014; CARVALHO-SIQUEIRA, 2019). Vale ressaltar que o estado de Sergipe configura uma região de elevada prevalência de doença falciforme.

Os pacientes envolvidos foram divididos em 2 grupos distintos: um grupo composto por pacientes portadoras de doença falciforme e úlcera de pernas e um grupo composto por pacientes com doença falciforme sem histórico de lesão em pernas. No intuito de minimizar vieses, os grupos foram pareados quanto à idade, presença de comorbidades e uso de medicamentos.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram adotados como critérios de inclusão para o grupo com úlceras falcêmicas: ser portador de anemia falciforme (homozigose) e apresentar úlcera de perna ativa ou antecedente de úlcera em membros inferiores. Quanto ao grupo com anemia falciforme sem úlcera, foram adotados os seguintes critérios de inclusão: ser portador de anemia falciforme (homozigose) e não apresentar úlcera ativa ou história de úlcera em membros inferiores.

Para evitar fatores de confusão inerentes à atividade da doença falciforme e da estabilidade clínica dos pacientes, foram adotados os critérios de exclusão descritos por Ballas (2012): crises vasooclusivas nas últimas 4 semanas, internamento hospi-

talar nos últimos 3 dias, hemotransfusões nos últimos 4 meses, doenças infecciosas ou inflamatórias nas últimas 4 semanas e uso de antibióticos nas últimas 3 semanas.

VARIÁVEIS E COLETA DE DADOS

Os pacientes foram avaliados por entrevista, utilizando questionário estruturado elaborado, constando os seguintes dados: nome completo, sexo (masculino ou feminino), idade (em anos), etnia (branco, pardo, amarelo e negro), comorbidades (hipertensão arterial sistêmica, diabetes melito, dislipidemia, insuficiência venosa periférica, doença arterial obstrutiva periférica, cardiopatia, pneumopatia crônica, hepatopatia crônica e doença renal crônica) e medicamentos em uso regular (Ácido Fólico 5mg/dia e Hidroxiuréia 20-35mg/Kg/dia). Para a conferência de dados e observação de informações quanto ao genótipo da doença, medicamentos prescritos, uso de hemoderivados, internações hospitalares, ocorrência de complicações relacionadas à doença, bem como outras informações que se mostrassem relevantes, foram consultados os prontuários físicos dos pacientes.

Quanto às úlceras de pernas, foi observada a presença de lesão ativa no momento da entrevista e questionado quanto aos antecedentes de lesão em membros inferiores. Quanto a características das lesões, foram questionados os seguintes pontos: membros acometidos (apenas uma perna ou ambas as pernas), tempo máximo de evolução das lesões em meses (tempo necessário para a completa cicatrização da lesão) e número de recorrências das lesões (número de reaparecimentos da lesão após a total cicatrização).

Quanto aos marcadores laboratoriais de hemólise, foram dosados: hemoglobina sérica, desidrogenase láctica (DHL) e bilirrubina total. Tais marcadores de hemólise foram selecionados por serem amplamente utilizados na literatura (NOLAN, 2006; CUMMING, 2008; TAYLOR, 2008; CONNES, 2013; MINNITI, 2014). Apesar de a programação inicial englobar a dosagem de reticulócitos e de hemoglobina fetal, não foi possível a realização desses exames devido à falta de recursos. Foi então coletado sangue venoso periférico, sendo imediatamente enviado ao Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFS para dosagem de hemoglobina total (STKS, Coulter) e de DHL e bilirrubinas (Cobas Integra Plus 400, Roche).

Quanto aos marcadores inflamatórios, foi utilizado um kit de dosagem que englobasse citocinas pro-inflamatórias produzidas por células Th1 envolvidas na imunidade

inata (IL-1b, IL-8 e TNF-alfa), citocinas pro-inflamatórias produzidas por células Th17 (IL-6) e citocinas anti-inflamatórias (IL-10). Tais marcadores são amplamente citados na literatura revisada (BOWERS, 2013; DA SILVA, 2014; REGO, 2015; CARVALHO-SIQUEIRA, 2019). Foi coletada amostra de sangue venoso periférico, prontamente centrifugada a 1.258g por 15min, sendo o plasma armazenado a -80°C. As citocinas foram dosadas por imunoenensaio baseado em anticorpos e painéis de quantificação de proteína usando as plataformas Luminex e Procarta Plex (Thermo Fisher Scientific).

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados foram armazenados e tabulados usando as ferramentas do Excel e Pages, de propriedade dos pesquisadores. Foi utilizada estatística descritiva e análises de associação. As associações foram avaliadas por meio do teste do Qui-Quadrado (χ^2) e Teste T-Student para as variáveis paramétricas, e teste de Mann-Whitney para variáveis não paramétricas, sendo adotado nível de significância de $p=0,05$. Foi também estimado o tamanho de efeito através da correlação Rank-Bisserial e do teste do d de Cohen. Os resultados foram expressos em termos absolutos e porcentagens, e visualizados através de tabelas e gráficos.

ASPECTOS ÉTICOS

A proposta de trabalho foi submetida ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe, visando atender às recomendações da resolução nº466/2012 e das resoluções complementares do Conselho Nacional de Saúde (CNS), como braço do estudo “Disfunção endotelial e alterações do metabolismo lipídico e ósseo na anemia falciforme”, com parecer de aprovação número 2.897.835. Todo o estudo primou em minimizar os possíveis riscos aos quais os participantes estavam suscetíveis. Todos os pacientes tiveram o direito de desligar-se do estudo a qualquer momento e independentemente do motivo alegado. Foi garantido o sigilo absoluto quanto aos dados coletados e o total acesso do participante ao seu prontuário.

RESULTADOS

Inicialmente foram arrolados 53 pacientes que preenchiam os critérios estabelecidos, sendo 22 portadores de anemia falciforme com úlcera em pernas e 31 portadores de anemia falciforme sem úlcera. No entanto, devido a perdas amostrais por não comparecimento às chamadas, óbito e falha no processamento laboratorial, foram incluídos 32 pacientes, sendo 19 portadores de anemia falciforme com úlcera e 13 portadores de anemia falciforme sem úlcera. Apesar das publicações indicarem uma prevalência de cerca de 10% de úlceras de perna entre os pacientes com anemia falciforme (PALADINO, 2007), esses pacientes são frequentemente subdiagnosticados, o que torna o rastreamento desses pacientes muito difícil. Apesar da redução do tamanho, a amostra é compatível com as amostras utilizadas nos principais estudos publicados sobre o tema.

O grupo de portadores de úlcera falcêmica foi composto por 10 (52,63%) pacientes do sexo masculino e 9 (47,36%) do sexo feminino, com média etária de 27 anos (19-34 anos) e com todos se autodeclarando pardos. Apenas 1 (5,26%) paciente relatou comorbidade, cardiopatia, estando clinicamente compensada. Nenhum paciente relatou ou apresentou em prontuário condição médica, além da doença falciforme, que justificasse a ocorrência de úlceras crônicas em membros inferiores. Todos os pacientes relatavam uso regular de Ácido Fólico 5mg/dia, sendo que 12 (63,15%) também relatavam uso regular de Hidroxiuréia 20-35mg/Kg/dia. Entre os pacientes, 8 (42,1%) apresentavam antecedente de úlceras em ambas as pernas e 11 (57,89%) em apenas um dos membros. Quanto à duração máxima de lesão ativa, foi observada uma média de 18 meses (0,25-84 meses), com 6 (31,58%) casos de duração entre 1 e 6 meses e 5 (26,31%) de mais de 12 meses. Quanto às recorrências, 9 (47,37%) pacientes relataram recidiva das lesões, sendo 8 (42,11%) com mais de uma recidiva e média de 1,78 recidivas/paciente.

Já o grupo de pacientes portadores de anemia falciforme sem história de úlcera em pernas foi composto por 5 (38,46%) pacientes do sexo masculino e 8 (61,54%) do sexo feminino, com média etária de 28,15 anos (21-38 anos), sendo todos autodeclarados pardos. Apenas 1 paciente relatou comorbidade, cardiopatia, estando clinicamente compensada. Quanto aos medicamentos em uso, 12 (92,30%) pacientes relatavam uso regular de Ácido Fólico 5mg/dia, sendo que 10 (76,92%)

deles também relatavam uso regular de Hidroxiuréia 20-35mg/Kg/dia.

Nenhum paciente, em ambos os grupos, relatou ocorrência de crises vasoclusivas nas 4 semanas anteriores à entrevista, internamento hospitalar nos 3 dias anteriores, hemotransfusões nos 4 meses anteriores, doenças infecciosas ou inflamatórias nas 4 semanas anteriores, ou uso de antibióticos nas 3 semanas anteriores à coleta de dados. Tais critérios, descritos por Ballas e colaboradores (2102), foram de fundamental importância para redução de vieses relacionados à hemólise e à inflamação.

Tabela 1. Dados clínicos-epidemiológicos de pacientes com úlcera falcêmica e anemia sem úlcera.

| Variáveis | Anemia Falciforme Sem Úlcera | Anemia Falciforme Com Úlcera |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Idade | | |
| 10-20 anos | 0 | 2 (10,53%) |
| 20-30 anos | 9 (69,23%) | 14 (73,68%) |
| > 30 anos | 4 (30,77%) | 3 (15,79%) |
| Sexo | | |
| Masculino | 5 (38,46%) | 10 (52,63%) |
| Feminino | 8 (61,54%) | 9 (47,36%) |
| Etnia | | |
| Pardos | 13 (100%) | 19 (100%) |
| Comorbidades | | |
| | 1 (7,69%) | 1 (5,26%) |
| Medicamentos em uso | | |
| Ácido Fólico | 12 (92,30%) | 19 (100%) |
| Hidroxiuréia | 10 (76,92%) | 12 (63,15%) |
| Úlceras falcêmicas | | |
| Membro sacometidos | | |
| Unilateral | - | 11 (57,89%) |
| Bilateral | - | 8 (42,1%) |
| Tempos de lesão ativa | | |
| < 1 mês | - | 4 (21,05%) |
| 1-6 meses | - | 6 (31,58%) |
| 7-12 meses | - | 4 (21,05%) |
| >12 meses | - | 5 (26,31%) |
| Recorrências | | |
| Sem recidivas | - | 10 (52,63%) |
| 1 recidiva | - | 1 (5,26%) |
| > 1 recidiva | - | 8 (42,11%) |

Os dados referentes aos marcadores de hemólise estudados (hemoglobina, DHL e bilirrubina total) foram tabulados e confrontados com a ocorrência de úlceras falcêmicas, o tempo de lesão ativa e a recorrência das lesões. A hemoglobina média entre os pacientes com úlcera foi de 8,81g/dL enquanto entre os indivíduos com anemia falciforme sem úlcera foi de 9,11g/dL, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,49$). Quanto ao DHL, observou-se uma média de 1.014ui/L entre os pacientes com lesão ulcerosa e de 740,54ui/L entre os sem lesão, também não sendo constatada diferença estatística entre os grupos ($p=0,21$). Por fim, quando analisados os níveis de bilirrubina total sérica, notou-se uma média de 3,92mg/dL entre os portadores de úlcera e 2,45mg/dL entre os sem úlcera, mais uma vez não sendo constatada diferença significativa entre os dois grupos ($p=0,12$). Quando calculado o tamanho de efeito, segundo a correlação Rank-Bisserial, foram observadas correlações baixas entre ocorrência de úlcera e níveis mais baixos de hemoglobina (15,0%), níveis mais elevados de DHL (27,1%) e níveis mais elevados de bilirrubina total (32,8%).

Analisando os portadores de úlcera falcêmica, quando confrontados os marcadores de hemólise estudados e o tempo de lesão ativa, foi observada correlação estatisticamente significativa entre um maior tempo de úlcera ativa e níveis mais baixos hemoglobina ($p=0,025$), níveis mais elevados DHL ($p=0,015$) e níveis mais elevados de bilirrubina total ($p=0,009$). Analisando a relação entre os marcadores de hemólise e a recorrência das úlceras, foi notada correlação estatisticamente significativa entre números de recidivas e níveis mais elevados de DHL ($p=0,023$). Quanto a relação entre recorrência das lesões, níveis mais baixos de hemoglobina e níveis mais elevados de bilirrubinas não foi observada significância estatística, sendo os valores de “p” respectivamente 0,097 e 0,055.

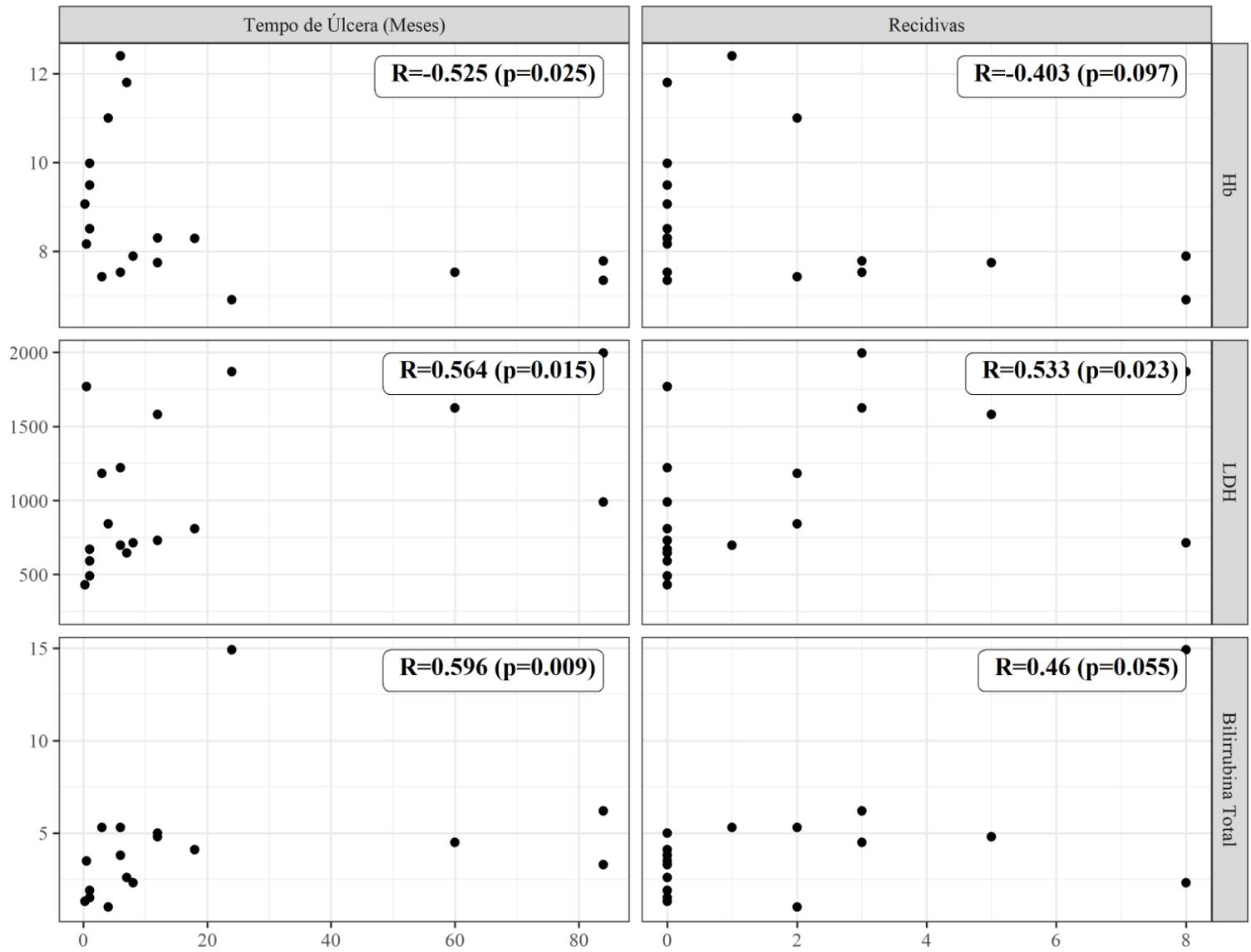


Gráfico 1. Correlação entre marcadores de hemólise, tempo de úlcera ativas e número de recidivas.

Os dados acerca dos marcadores inflamatórios analisados (IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF-alfa) foram tabulados e confrontados com a ocorrência, o tempo de lesão ativa e a recorrência das úlceras falcêmicas. A citocina pró-inflamatória IL-1b apresentou média de 6,47pg/mL entre os pacientes com úlcera e de 4,51pg/mL entre os indivíduos sem úlcera, não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,16$). A citocina pró-inflamatória IL-8 apresentou média de 0,03pg/mL entre os pacientes com úlcera e de 0,26pg/mL entre os sem lesão, também não sendo constatada diferença estatística entre os grupos ($p=0,20$). A citocina pró-inflamatória relacionada ao Th17, IL-6, apresentou média de 48,03pg/mL entre os pacientes com lesão e de 34,25pg/mL entre os sem lesão, não sendo constatada diferença estatística entre os grupos ($p=0,11$). Quanto ao TNF-alfa, que possui atividade inflamatória fundamental à resposta imune inata, apresentou média de 40,86pg/mL entre os portadores de úlcera e 28,29pg/mL entre os sem úlcera, mais uma vez não sendo constatada diferença significativa entre os grupos ($p=0,30$). Ao analisar a citocina anti-inflamatória IL-10, observou-se uma média de 3,61pg/mL entre os portadores de lesão ulcerosa e de 2,71pg/mL entre pacientes sem úlcera, também não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,15$). Ao ser calculado o tamanho de efeito, segundo o Teste d de Cohen, foram observadas correlações moderadas entre o surgimento de úlcera e níveis plasmáticos mais elevados de IL-1b (52,8%) e de IL-6 (60,4%), e de IL-10 (53,0%). Ao ser calculado o tamanho de efeito segundo o Rank-Bisserial, foi notada apenas uma fraca correlação entre o surgimento de úlceras e os níveis de IL-8 (22,0%) e de TNF-alfa (22,6%).

Ao analisar a relação entre os marcadores inflamatórios e o tempo de lesão ativa, não foi evidenciada relação estatisticamente significativa entre níveis plasmáticos das citocinas pro-inflamatórias IL-1b, IL-6, IL-8 e TNF-alfa, e da citocina anti-inflamatória IL-10, com a ocorrência de lesões em pernas, com o "p" variando entre 0,22 e 0,91. Quanto à relação entre os marcadores de inflamação e a recorrência das úlceras, foi notada relação significativa apenas entre recidivas e níveis plasmáticos da citocina pro-inflamatória IL-6 ($p=0,046$).

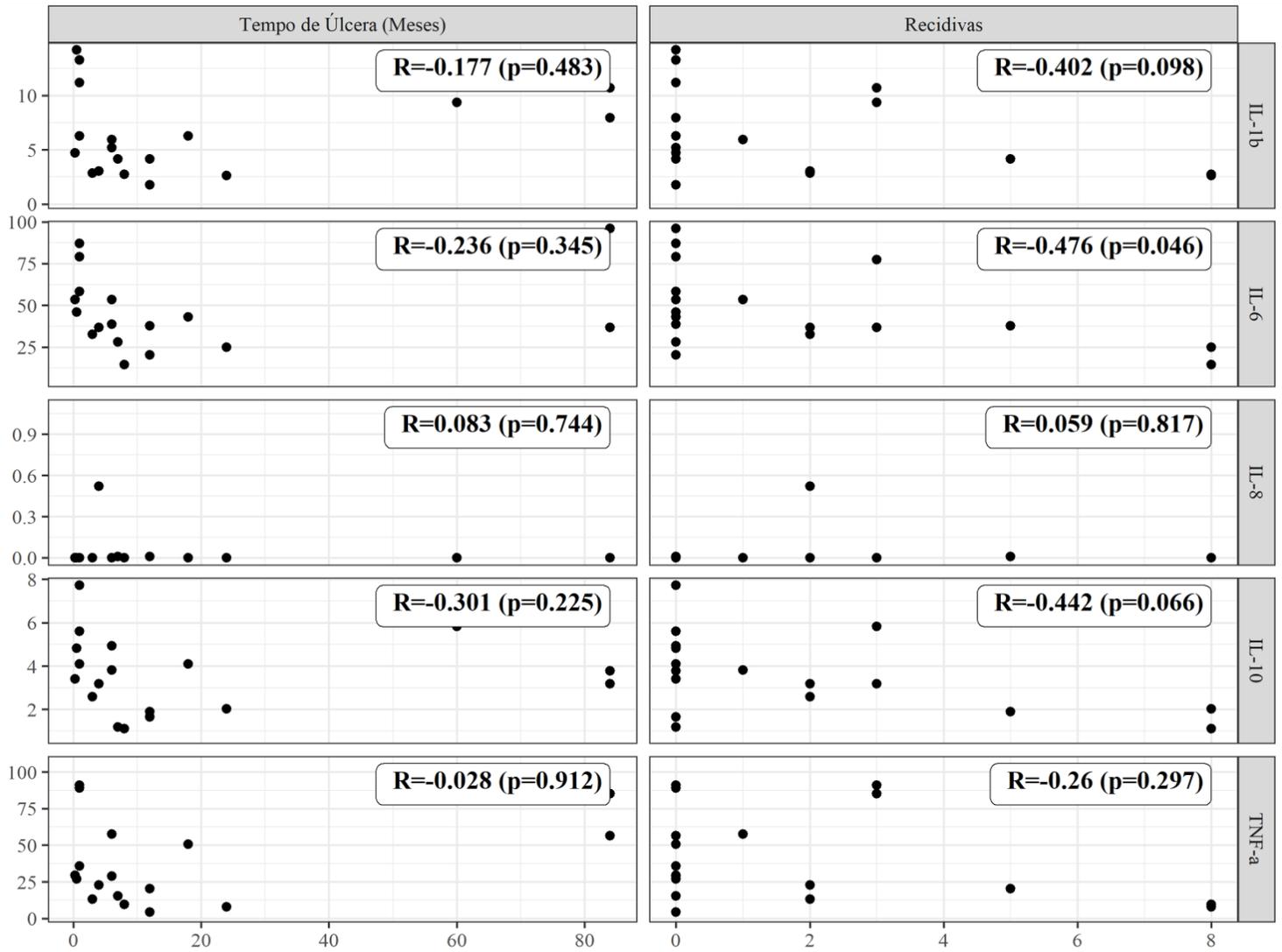


Gráfico 2. Correlação entre marcadores inflamatórios, tempo de úlcera ativa e número de recidivas.

Tabela 2. Correlação entre marcadores de hemólise e de inflamação e coerência de úlceras falcêmicas.

| | ÚLCERA | | | | p-valor | TE |
|-------------------|---------------|---------------------|----------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| | Sim | | Não | | | |
| | Média (DP) | Mediana (IIQ) | Média (DP) | Mediana (IIQ) | | |
| Hb | 8,81 (1,59) | 8,29 (7,52-9,98) | 9,11 (1,45) | 9,05 (8,07-10,26) | 0,490 ^W | -0,150 ^B |
| DHL | 1014 (516,01) | 810 (646-1581) | 740,54 (289,2) | 698 (554,5-904,5) | 0,210 ^W | 0,271 ^B |
| BILI TOTAL | 3,92 (3,1) | 3,5 (1,9-5) | 2,45 (1,13) | 2,6 (1,45-2,8) | 0,120 ^W | 0,328 ^B |
| IL-1b | 6,47 (3,82) | 5,57 (3-9,71) | 4,51 (3,59) | 3,42 (1,82-6,74) | 0,160 ^T | 0,528 ^D |
| IL-6 | 48,03 (23,49) | 40,84 (31,55-63,13) | 34,25 (22,13) | 34,3 (18,25-37,71) | 0,110 ^T | 0,604 ^D |
| IL-8 | 0,03 (0,12) | 0 (0-0) | 0,26 (0,42) | 0 (0-0,63) | 0,200 ^W | -0,220 ^B |
| IL-10 | 3,61 (1,76) | 3,59 (1,99-4,85) | 2,71 (1,62) | 2,09 (1,59-3,75) | 0,150 ^T | 0,530 ^D |
| TNF-a | 40,86 (30,62) | 29,16 (14,91-64,56) | 28,29 (26,27) | 22,71 (11,67-33,95) | 0,300 ^W | 0,226 ^B |

Legenda:Hb - Hemoglobina. DHL - Desidrogenase láctica. Bili Total - Bilirrubina Total. IL - Interleucina. TNF-a - Fator de Necrose Tumoral Alfa. DP – Desvio Padrão. IIQ – Intervalo Interquartil. W – teste de Mann-Whitney. T – Teste t para amostras independentes. TE – tamanho de Efeito. B – Correlação Rank Biserial. D – d de Cohen.

DISCUSSÃO

O estudo das úlceras de pernas em pacientes com doença falciforme, as úlceras falcêmicas, é de fundamental importância para uma melhor compreensão de uma complicação importante de uma doença prevalente, porém negligenciada. O nordeste do Brasil configura a região de maior prevalência da hemoglobinopatia no país, sendo Sergipe um estado que abriga um grande número de casos, no entanto, com escassez de dados.

No estudo, foi notado que os pacientes portadores de úlcera falcêmica foram predominantemente do sexo masculino, com média etária de 27 anos, sendo todos autodeclarados pardos. Esses pacientes eram frequentadores assíduos do ambulatório de hematologia ao qual estavam cadastrados, não apresentando nenhuma comorbidade que justificasse a ocorrência de úlceras em pernas além da anemia falciforme. Apenas 1 paciente relatou comorbidade relevante, cardiopatia clinicamente compensada. O uso de Hidroxiuréia, medicamento cuja associação com úlcera falcêmica é questionada por alguns autores (LANARO, 2009), foi observado em 63,15% dos pacientes. As lesões ulcerosas foram majoritariamente unilaterais, resistentes e recorrentes.

A literatura revisada freqüentemente descreve um perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de úlcera falcêmica similar ao observado no estudo. É relatada na literatura a ocorrência de úlcera predominantemente entre 10 e 25 anos de idade, sendo pouco frequente em menores de 10 anos e em maiores de 30 anos (SERJEANT, 2005). Já a distribuição entre os sexos ainda permanece incerta, com algumas publicações indicando maior prevalência entre homens (KOSHY, 1989; ANKRA-BADU, 1992; PALADINO, 2007; BAZUAYE, 2010), enquanto outras não evidenciando diferença entre os sexos (ADEDEJI, 1987). Chama a atenção o fato de todos os pacientes terem se autodeclarados pardos, já que a anemia falciforme é uma doença que acomete majoritariamente a população negra. Quanto ao comportamento da lesão ulcerosa, fica evidente o caráter indolente e uma tendência à recorrência (BALLAS, 2002; MINNITI, 2016).

Apesar das características clínicas e epidemiológicas dos pacientes estudados corroborarem, em sua maioria, com os dados descritos na literatura revisada, alguns aspectos sócio-econômicos merecem ser ressaltados. Embora extrapole os

objetivos do estudo, vale ressaltar que todos os pacientes estudados eram provenientes de grupos sociais vulneráveis, com renda mensal igual ou inferior a um salário mínimo, sendo muitos deles dependente de programas de auxílio governamental. A maioria dos envolvidos referia dificuldades no tratamento das lesões, como falta de insumos ou de assistência em saúde, dificuldades sociais, comprometimento da auto-estima, bem como transtornos psiquiátricos. Apesar de o estudo ser incapaz de definir a relação precisa dessas variáveis ao surgimento e cicatrização das úlceras falcêmicas, é razoável inferir que a situação sócio-econômica precária da maioria dos pacientes influencia a evolução dessas lesões.

Avaliada a relação entre úlcera falcêmica e hemólise, não foi evidenciada correlação significativa entre hemoglobina, LDH, bilirrubinas e ocorrência de úlceras. Segundo a correlação Rank-Bisserial, foram observadas correlações baixas a favor das relações hemoglobina e úlcera, LDH e úlcera, e bilirrubina total e úlcera. Quando avaliada a relação entre hemólise e tempo de lesão ativa, foi observada correlação significativa entre hemoglobina, LDH, bilirrubina total e tempo de lesão. Quanto à relação entre hemólise e número de recidivas, foi notada significância estatística apenas entre LDH, bilirrubina total e recorrência da lesão.

Embora a literatura revisada aponte alguma associação entre o grau de hemólise e o surgimento de úlceras falcêmicas, os achados são heterogêneos e por vezes contraditórios. Nolan e colaboradores observaram que pacientes com úlcera falcêmica apresentavam hemólise mais grave, com níveis de reticulócitos, LDH, bilirrubinas e AST mais elevados (NOLAN, 2006). Connes e colaboradores relataram que pacientes com lesões de perna recorrente apresentavam níveis mais elevados de LDH, bem como hemoglobina mais baixa que os pacientes sem história de úlcera (CONNES, 2013). Minitti e colaboradores observaram que pacientes com úlcera apresentam baixa hemoglobina total, além de reticulócitos, bilirrubinas, AST e, sobretudo, LDH mais elevados que os pacientes com anemia falciforme sem úlcera (MINITTI, 2014). Antwi-Boasiako e colaboradores propuseram uma associação entre úlceras e marcadores de hemólise, sobretudo hemoglobina mais baixa e bilirrubina total mais elevada (ANTWI-BOASIAKO, 2020). Já Dubert e colaboradores, após ajuste para sexo, idade e fenótipo da anemia falciforme, observaram correlação significativa das úlceras falcêmicas apenas com os níveis de hemoglobina (DUBERT, 2017). Por fim, Olatunya e colaboradores salientaram que a hemólise intravascular

talvez não seja suficiente para explicar o surgimento dessas lesões (OLATUNYA, 2019).

A correlação entre a intensidade da hemólise e diversas complicações da anemia falciforme já é bem documentada. Quando abordamos especificamente úlceras falcêmicas, essa correlação ainda não está bem estabelecida. No estudo, não foi observada correlação significativa entre os marcadores de hemólise analisados e o surgimento de úlceras, porém, notou-se uma relação entre níveis mais baixos de hemoglobina e um maior tempo de lesão ativa, além de níveis mais elevados de bilirrubina e LDH tanto com um maior tempo de lesão quanto com um maior número de recidivas. Propõe-se que a hemólise possa estar associada à evolução das úlceras falcêmicas, porém, não constituindo um fator fundamental para sua ocorrência, o que limitaria o papel dos marcadores laboratoriais de hemólise como preditores de úlceras de perna em pacientes com anemia falciforme.

Ao avaliar a associação entre úlceras e inflamação, não foi evidenciada correlação estatisticamente significativa entre os níveis das citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias analisadas e a ocorrência de úlceras falcêmicas. Segundo o Teste d de Cohen, foram observadas correlações apenas moderadas entre ocorrência de úlcera e as citocinas IL-1b, IL-6 e IL-10 e, segundo a correlação Rank-Bisserial, correlações fracas entre úlcera, IL-8 e TNF-alfa. Não foi notada associação significativa entre os marcadores de inflamação dosados e o tempo de lesão ativa, sendo evidenciada correlação apenas entre níveis mais elevados de IL-6 e ocorrência de recidivas.

A associação entre inflamação e úlcera falcêmica vem sendo questionada na literatura. Bowers e colaboradores, ao avaliarem pacientes com doença falciforme e úlcera, propuseram que IL-1b, IL-10 e TNF-alfa possam estar associados às úlceras. Porém, o próprio autor ressalta que a real associação desses marcadores inflamatórios com as lesões ainda não está clara (BOWERS, 2013). Da Silva e colaboradores relataram níveis elevados de IL-6, IL-17a e IL-22 em pacientes falcêmicos com úlceras em pernas (DA SILVA, 2014). De forma similar, Domingos e colaboradores demonstraram a associação entre IL-8 e a ocorrência de úlceras (DOMINGOS, 2020). Já Rego e colaboradores (2015) observaram níveis mais elevados de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, em portadores úlceras falcêmicas (REGO, 2015). Mais recen-

temente, Belisário e colaboradores reportaram que pacientes com úlceras apresentam níveis significativamente mais elevados de IL-8, IL-10 e IL-15 (BELISÁRIO, 2022).

Embora a correlação entre marcadores inflamatórios e a ocorrência de úlceras falcêmicas seja relatada, a real associação entre inflamação e essas lesões ainda não está clara. Ao estudar uma amostra pareada para idade, comorbidades e medicamentos em uso, e excluindo os principais fatores de confusão (como uso de hemoderivados, crises vaso-oclusivas e instabilidade clínica), não foi evidenciada correlação estatisticamente significativa entre citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, o surgimento nem a evolução das úlceras falcêmicas. Esse achado aponta para uma natureza ainda incerta dessas lesões, na qual fenômenos inflamatórios provavelmente não desempenhem papel fundamental.

Diante dos dados observados, propõe-se que tanto a hemólise quando a inflamação sejam apenas fatores implicados em um mecanismo multifatorial complexo. Assim como em úlceras crônicas de outras etiologias, a exemplo da úlcera em pacientes com diabetes melito, propõe-se que a úlcera falcêmica resulte da interação de múltiplos fatores envolvendo não apenas atividade hemolítica e desbalanço inflamatório, mas também, insuficiência venosa, infecções bacterianas e neuropatia periférica. Dessa forma, a ausência de apenas um dos fatores envolvidos na fisiopatogenia não descartaria da ocorrência das úlceras, o que limita o uso isolado de marcadores de hemólise e de inflamação como preditores da ocorrência e da cicatrização dessas lesões. Sugere-se, portanto, uma visão mais ampla da fisiopatogenia das úlceras cutâneas em pacientes com anemia falciforme, dando-se maior ênfase a uma associação de múltiplos fatores, tanto sistêmicos quanto locais, e menor relevância a marcadores laboratoriais de forma isolada.

CONCLUSÃO

O estudo propôs a investigação de fatores potencialmente relacionados ao surgimento e cicatrização das úlceras falcêmicas, notadamente hemólise e inflamação. No entanto, não foi evidenciada correlação estatisticamente significativa entre os marcadores de hemólise, as citocinas e as úlceras. Sugere-se que tanto a hemólise quanto a inflamação exerçam papéis secundários em um mecanismo multifatorial complexo da etiopatogenia das úlceras falcêmicas, não configurando condições imprescindíveis para a ocorrência dessas lesões.

FRAGILIDADES DO ESTUDO

São apontadas como as principais fragilidades do estudo a utilização de uma amostra, apesar de relevante, pequena, as limitações inerentes ao desenho metodológico quanto à sua transversalidade e a escassez de insumos laboratoriais.

IMPLICAÇÕES

O estudo propõe uma mudança no entendimento das úlceras falcêmicas, o que implica, sobretudo, em uma menor relevância de marcadores laboratoriais e uma maior importância do contexto multifatorial, envolvendo tanto fatores sistêmicos quanto locais, repercutindo inclusive na abordagem terapêutica dessas lesões. Novas investigações acerca do tema se tornam fundamentais para uma melhor compreensão da etiologia dessas lesões, no intuito de auxiliar na sua prevenção e tratamento.

REFERÊNCIAS

- ADEDEJI MO, Emokpare CI. Bacteriology of sickle-cell leg ulcers in the equatorial forest belt of South-Western Nigeria. *J Trop Med Hyg.* 1987 Dec;90(6):297-300. PMID:3323544.
- ANKRA-BADU GA. Sickle cell leg ulcers in Ghana. *East Afr Med J.* 1992 Jul;69(7):366-9. PMID:1396190.
- ANTWI-BOASIAKO C, Andemariam B, Colombatti R, Asare EV, Strunk C, Piccone CM, Manwani D, Boruchov D, Farooq F, Urbonya R, Wilson S, Boatemaa GD, Perrotta S, Sainati L, Rivers A, Rao S, Zempsky W, Ekem I, Sey F, Segbefia C, Inusa B, Tartaglione I, Campbell AD. A study of the geographic distribution and associated risk factors of leg ulcers within an international cohort of sickle cell disease patients: the CASiRe group analysis. *Ann Hematol.* 2020 Sep;99(9):2073-9. DOI:10.1007/s00277-020-04057-8.
- ANVISA. Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. Brasília, 2002. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/anvisa/diagnostico.pdf>.
- BALLAS SK. Treatment of painful sickle cell leg ulcers with topical opioids. *Blood.* 2002 Feb 1;99(3):1096. DOI:10.1182/blood.v99.3.1096.
- BALLAS SK. More definitions in sickle cell disease: steady state v base line data. *Am J Hematol.* 2012 Mar;87(3):338. DOI:10.1002/ajh.22259.
- BAZUAYE GN, Nwannadi AI, Olayemi FE. Leg ulcers in adult sickle cell disease patients in Benin city Nigeria. *Gomal J Med Sci.* 2010;8(2):190-4.
- BELISÁRIO AR, Mendes-Oliveira F, de Souza VR, Bolina-Santos E, Mendes FG, Moreno EC, Franca AT, Sabino EC, Otta DA, de Faria ES, Coelho-Dos-Reis JGA, Martins-Filho OA, Carneiro-Proietti AB. Association between inflammatory molecules, nitric oxide metabolites and leg ulcers in individuals with sickle cell anemia. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2022 Apr-Jun;44(2):169-76. DOI:10.1016/j.htct.2020.09.152.
- BOWERS AS, Reid HL, Greenidge A, Landis C, Reid M. Blood viscosity and the expression of inflammatory and adhesion markers in homozygous sickle cell disease subjects with chronic leg ulcers. *PLoS One.* 2013 Jul 26;8(7):e68929. DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068929>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Educação em saúde. Linha de cuidado em doença falciforme. Brasília, 2009. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_educacao_saude_v2.pdf.
- BRIGGS M, Flemming K. Living with leg ulceration: a synthesis of qualitative research. *J Adv Nurs.* 2007 Aug;59(4):319-28. DOI:10.1111/j.1365-2648.2007.04348.x.
- CANÇADO RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil: (editorial). *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007; 29 (3): 204-6.
- DE CARVALHO-SIQUEIRA GQ, Ananina G, Souza BB, Borges MG, Ito MT, Silva-Costa SM, Domingos IF, Falcão DA, Lopes-Cendes I, Bezerra MAC, Araujo AS, Lucena-Araujo AR, Gonçalves MS, Saad STO, Cotsa FF, Melo MB. Whole-exome sequencing indicates FLG2 variant associated with leg ulcers in Brazilian sickle cell anemia patients. *Exp Biol Med (Maywood).* 2019 Aug;244(11):932-9. DOI:10.1177/1535370219849592.

CAVALCANTI, Juliana Manzoni; MAIO, Marcos Chor. Entre negros e miscigenados: a anemia e o traço falciforme no Brasil nas décadas de 1930 e 1940. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*, Rio de Janeiro, v.18, n.2, p.377-406, abr.-jun. 2011.

CLARE A, FitzHenley M, Harris J, Hambleton I, Serjeant GR. Chronic leg ulceration in homozygous sickle cell disease: the role of venous incompetence. *Br J Haematol*. 2002 Nov;119(2):567-71. DOI:10.1046/j.1365-2141.2002.03833.x.

CONNES P, Lamarre Y, Hardy-Dessources MD, Lemonne N, Waltz X, Mougénel D, Mukisi-Mukaza M, Lalanne-Mistrih ML, Tarer V, Tressières B, Etienne-Julan M, Romana M. Decreased hematocrit-to-viscosity ratio and increased lactate dehydrogenase level in patients with sickle cell anemia and recurrent leg ulcers. *PLoS One*. 2013 Nov 4;8(11):e79680. DOI:10.1371/journal.pone.0079680.

CUMMIG V, King L, Fraser R, Serjeant G, Reid M. Venous incompetence, poverty and lactate dehydrogenase in Jamaica are important predictors of leg ulceration in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2008 Jul;142(1):119-25. DOI:10.1111/j.1365-2141.2008.07115.x.

DA SILVARR, Pereira MC, Melo Rêgo MJ, Domingues Hatzlhofer BL, da Silva Araújo A, Cavalcanti Bezerra MA, da Rocha Pitta I, da Rocha Pitta MG. Evaluation of Th17 related cytokines associated with clinical and laboratorial parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine*. 2014 Feb;65(2):143-7. DOI:10.1016/j.cyto.2013.11.012.

DE CARVALHO-SIQUEIRA GQ, Ananina G, Souza BB, Borges MG, Ito MT, Silva-Costa SM, Domingos IF, Falcão DA, Lopes-Cendes I, Bezerra MAC, Araujo AS, Lucena-Araujo AR, Gonçalves MS, Saad STO, Cotsa FF, Melo MB. Whole-exome sequencing indicates FLG2 variant associated with leg ulcers in Brazilian sickle cell anemia patients. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2019 Aug;244(11):932-9. DOI:10.1177/1535370219849592.

DOMINGOS I, Pereira-Martins D, Sobreira M, Oliveira R, Alagbe A, Lanaro C, Albuquerque D, Blotta M, Araujo A, Costa F, Lucena-Araujo A, Sonati M, Bezerra MAC, Santos M. High levels of proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8 are associated with a poor clinical outcome in sickle cell anemia. *Ann Hematol*. 2020 May;99(5):947-53. DOI:10.1007/s00277-020-03978-8.

DUBERT M, Elion J, Tolo A, Diallo DA, Diop S, Diagne I, Sanogo I, Belinga S, Guifo O, Wamba G, Ngo Sack F, Boidy K, Kamara I, Traore Y, Diakite CO, Gbonon V, Faye BF, Seck M, Deme Ly I, Chelo D, N'Guetta R, Diop IB, Gaye B, Jouven X, Ranque B. Degree of anemia, indirect markers of hemolysis, and vascular complications of sickle cell disease in Africa. *Blood*. 2017 Nov 16;130(20):2215-23. DOI:10.1182/blood-2016-12-755777.

DUCATTI RP, Teixeira AEA, Galão HA, Bonini-Domingos CR, Fett-Conte AC. Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto. *Rev Bras Hematol Hemoter* Abr 2001; 23 (1):23-9. DOI:https://doi.org/10.1590/S1516-84842001000100004

EL KHATIB AM, Hayek SN. Leg ulcers in sickle cell patients: management challenges. *Chronic Wound Care Manage Res*. 2016;3:157-61.

FELIX AA, Souza HM, Ribeiro SBF. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(3):203-8. DOI:https://doi.org/10.1590/S1516-84842010005000072.

GRANJA PD, Quintão SBM, Perondi F, de Lima RBF, Martins CLM, Marques MA, de Oliveira JCP. Leg ulcers in sickle cell disease patients. *J Vasc Bras*. 2020 Nov 11;19:e20200054. DOI:10.1590/1677-5449.200054.

GUIMARÃES TMR, Miranda, WL, Tavares MMF. O cotidiano das famílias de crianças e adolescentes portadores de anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter* Feb 2009;31(1): 9-14. DOI:https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000002.

HALABI-TAWIL M, Lionnet F, Girot R, Bachmeyer C, Levy PP, Aractingi S. Sickle cell leg ulcers: a frequently disabling complication and a marker of severity. *Br J Dermatol*. 2008 Feb;158:339-44. DOI:10.1111/j.1365-2133.2007.08323.x.

HOKAZONO M, Silva GS, Silva EMK, Braga JAP. Results from transcranial Doppler examination on children and adolescents with sickle cell disease and correlation between the time-averaged maximum mean velocity and hematological characteristics: a cross-sectional analytical study. *São Paulo Med J*. 2020;129(3):134-8. DOI:https://doi.org/10.1590/S1516-31802011000300003.

ISA H, Adegoke S, Madu A, Hassan AA, Ohiaeri C, Chianumba R, Brown B, Okocha E, Ugwu N, Diaku-Akinwumi I, Adeyemo T, Kuliya-Gwarzo A, Dogara L, Lawal H, Tanko Y, Ladu A, Kangiwa U, Ekwem L, Oniyangi S, Wakama T, Umoru D, Olanrewaju O, Akinola N, Nnebe-Agumadu U, Asala S, Adekile A, Olaniyi J, Sangeda R, Sickle Africa Data Coordinating Center SADaCC, Nnodu O. Sickle cell disease clinical phenotypes in Nigeria: A preliminary analysis of the Sickle Pan Africa Research Consortium Nigeria database. *Blood Cells Mol Dis*. 2020 Sep;84:102438. DOI:10.1016/j.bcmd.2020.102438.

KATO GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, Gladwin MT. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *Am J Hematol*. 2009 Sep;84(9):618-25. DOI:10.1002/ajh.21475.

KOSHY M, Entsuaeh R, Koranda A, Kraus AP, Johnson R, Bellvue R, Flournoy-Gill Z, Levy P. Leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Blood*. 1989 Sep;74(4):1403-8. PMID:2475188.

LACERDA FKL, Ferreira SL, Nascimento ER, Costa DO, Cordeiro RC. Self-care deficits in women with leg ulcers and sickle cell disease. *Rev Bras Enferm*. 2019;72(Suppl 3):72-8. DOI:http://dx.doi.org/10.1590/0034-7167-2018-0005

LADIZINSKI B, Bazakas A, Mistry N, Alavi A, Sibbald RG, Salcido R. Sickle cell disease and leg ulcers. *Adv Skin Wound Care*. 2012 Sep;25(9):420-8. DOI:10.1097/01.ASW.0000419408.37323.0c.

LANARO C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol*. 2009 Feb;85(2):235-42. DOI:10.1189/jlb.0708445.

LEITE DCF, Cicolotti R, Gurgel RQ, Martins Filho PRS, Lopes GD. SPATIAL DISTRIBUTION OF NEWBORNS WITH SICKLE CELL TRAIT IN SERGIPE, BRAZIL. *Rev Paul Pediatr*. 2020 Mar 9;38:e2018229. DOI: 10.1590/1984-0462/2020/38/2018229. PMID: 32159643; PMCID: PMC7063597.

LERVOLINO LG, Baldin PE, Picado SM, Calil KB, Viel AA, Campos LA. Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011;33(1):49-54. DOI:10.5581/1516-8484.20110015.

LOBO CL, Ballas SK, Domingos AC, Moura PG, do Nascimento EM, Cardoso GP, de Carvalho SM. Newborn screening program for hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Jan;61(1):34-9. DOI:10.1002/pbc.24711.

MACK AK, Kato GJ. Sick cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(8):1237-43. DOI:10.1016/j.biocel.2006.01.010.

MAKIS AC, Hatzimichael EC, Bourantas KL. The role of cytokines in sickle cell disease. *Ann Hematol*. 2000 Aug;79(8):407-13. DOI:10.1007/s002770000173.

MANFREDINI V, Castro S, Wagner S, Benfato MDS. A fisiopatologia da anemia falciforme. *Infarma*, v.19 n.1/2, São Paulo, 2007. Disponível em:<http://www.revista-scf.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=216&path%5B%5D=204>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da Saúde: Anemia Falciforme; 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/955-sas-raiz/dahu-raiz/sangue-e-hemoderivados/l2-sangue-e-hemoderivados/13335-doenca-falciforme>.

MINNITI CP, Eckman J, Sebastiani P, Steinberg MH, Ballas SK. Leg ulcers in sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2010 Oct;85(10):831-3. DOI:10.1002/ajh.21838.

MINNITI CP, Delaney KM, Gorbach AM, Xu D, Lee CC, Malik N, Koroulakis A, Antalek M, Maivelett J, Peters-Lawrence M, Novelli EM, Lanzkron SM, Axelrod KC, Kato GJ. Vasculopathy, inflammation, and blood flow in leg ulcers of patients with sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 2014 Jan;89(1):1-6. DOI:10.1002/ajh.23571.

MINNITI CP, Kato GJ. Critical Reviews: How we treat sickle cell patients with leg ulcers. *Am J Hematol*. 2016 Jan;91(1):22-30. DOI:10.1002/ajh.24134..

MOHAN JS, Vigilance JE, Marshall JM, Hambleton IR, Reid HL, Serjeant GR. Abnormal venous function in patients with homozygous sickle cell (SS) disease and chronic leg ulcers. *Clin Sci (Lond)*. 2000 Jun;98(6):667-72. PMID:10814603.

MOHAN JS, Marshall JM, Reid HL, Thomas PW, Serjeant GR. Postural vasoconstriction and leg ulceration in homozygous sickle cell disease. *Clin Sci (Lond)*. 1997 Feb;92(2):153-8. DOI:10.1042/cs0920153..

MOHANDAS N, Evans E. Sick cell erythrocyte adherence to vascular endothelium. Morphologic correlates and the requirement for divalent cations and collagen-binding plasma proteins. *J Clin Invest*. 1985 Oct;76(4):1605-12. DOI:10.1172/JCI112144.

NADIAYE M, Niang SO, Diop A, Diallo M, Diaz K, Ly F, Dioussé P, Diatta BA, Seck NB, Diallo S, Ndiaye MT, Diadie S, Dieng MT, Kane A. Ulcères de jambe au cours de la drépanocytose: étude rétrospective de 40 cas [Leg ulcers in sickle cell disease: A retrospective study of 40 cases]. *Ann Dermatol Venereol*. 2016 Feb;143(2):103-7. French. DOI:10.1016/j.annder.2015.12.004.

NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na Anemia falciforme. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*,v.22, n.1, p.05-22, 2000.

NOLAN VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Ma Q, Wyszynski DF, Farrel JJ, Sebastiani P, Farrer LA, Steinberg MH. Sick cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF- β BMP pathway. *Br J Haematol*. 2006 Jun;133(5):570-8. DOI:10.1111/j.1365-2141.2006.06074.x.

NUSSBAUM SR, Carter MJ, Fife CE, DaVanzo J, Haught R, Nusgart M, Cartwright D. An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of

Chronic Nonhealing Wounds. *Value Health*. 2018 Jan;21(1):27-32. DOI:10.1016/j.jval.2017.07.007.

OLATUNYA OS, Lanaro C, Longhini AL, Penteado CFF, Fertrin KY, Adekile A, Saad STO, Costa FF. Red blood cells microparticles are associated with hemolysis markers and may contribute to clinical events among sickle cell disease patients. *Ann Hematol*. 2019 Nov;98(11):2507-21. DOI:10.1007/s00277-019-03792-x.

ONYEMAECHI NO, Enweani UN, Maduka CO. Musculoskeletal complications of sickle cell disease in Enugu, Nigeria. *Niger JMed*. 2011;20(4):456-62.PMID: 22288323.

PALADINO SF. Ulceras de membros inferiores na anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(3):188-90. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000300019>.

REES DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2010;376(9757):2018-31. DOI:10.1016/S0140-6736(10)61029-X.

REGO MJ, da Silva RR, Pereira MC, da Silva Araújo A, Pitta Ida R, Falcão DA, Bezerra MA, Pitta MG. Evaluation of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T cell populations, IL-10 production, and their correlation with clinical and biochemical parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine*. 2015 Oct;75(2):310-5. DOI:0.1016/j.cyt.2015.07.016.

ROBERTI MRF, Moreira CLNSO, Tavares RS, Borges Filho HM, Silva AG, Maia CHG et al. Avaliação da qualidade de vida em portadores de doença falciforme do Hospital das Clínicas de Goiás, Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010; 32(6): 449-54. DOI:<https://doi.org/10.1590/S1516-84842010000600008>.

SANTOS GEO. Cálculo Amostral: calculadora on-line. Disponível em:<http://www.calculoamostral.vai.la>.

SENET P, Blas-Chatelain C, Levy P, Manea EM, Peschanski M, Mirault T, Stankovic-Stojanovic K, Debure C, Debbache K, Girot R, Bureau JM, Bachmeyer C, Baldeschi C, Galacteros F, Lionnet F, Gellen-Dautremer J. Factors predictive of leg-ulcer healing in sickle cell disease: a multicentre, prospective cohort study. *Br J Dermatol*. 2017 Jul;177(1):206-11. DOI:10.1111/bjd.15241.

SERJEANT GR. Leg Ulceration in Sickle Cell Anemia. *Arch Intern Med*.1974;133(4):690-4. DOI:10.1001/archinte.1974.00320160184017

SERJEANT GR, Serjeant BE, Mohan JS, Clare A. Leg ulceration in sickle cell disease: medieval medicine in a modern world. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2005 Oct;19(5):943-56. DOI:10.1016/j.hoc.2005.08.005.

SILVA WS, de Oliveira RF, Ribeiro SB, da Silva IB, de Araújo EM, Baptista AF. Screening for Structural Hemoglobin Variants in Bahia, Brazil. *Int J Environ Res Public Health*. 2016 Feb 18;13(2):225. DOI:10.3390/ijerph13020225.

SINGH AP, Minniti CP. Leg Ulceration in Sickle Cell Disease: An Early and Visible Sign of End-Organ Disease. In: Inusa, B. P. D. , editor. *Sickle Cell Disease - Pain and Common Chronic Complications* [Internet]. London: IntechOpen. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/51543>. DOI:10.5772/64234.

SPIRA JAO, Borges EL, Junior JFP, Monteiro DS, Kitagawa KY. Estimativa de custos no tratamento de úlcera de perna por doença falciforme. *Rev Esc Enferm USP* · 2020;54:e03582. DOI:<https://doi.org/10.1590/S1980-220X2018053603582>

TAYLOR JG, Nolan VG, Mendelsohn L, Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. PLoS One. 2008;3(5):e2095. DOI:10.1371/journal.pone.0002095.

UMEH NI, Ajegba B, Buscetta AJ, Abdallah KE, Minniti CP, Bonham VL. The psychosocial impact of leg ulcers in patients with sickle cell disease: I don't want them to know my little secret. PLoS One. 2017 Oct 18;12(10):e0186270. DOI:10.1371/journal.pone.0186270.

VIVAS WLP,Rebouças DS, Fabbro ALO, Cipolotti R. Heterozigose para hemoglobinopatia em doadores de sangue do Centro de Hemoterapia de Sergipe. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. Dez 2006;28(4):284-7. DOI:https://doi.org/10.1590/S1516-84842006000400013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sickle-cell disease and other hemoglobin disorders; 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs308/en/>.

APÊNDICES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, alunos e professores do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe, convidamos-te a participar da pesquisa: “Disfunção endotelial e alterações do metabolismo lipídico e ósseo na anemia falciforme”, a realizar-seno Ambulatório de Hematologia Pediátrica do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, que tem como objetivo avaliar a relação entre marcadores de inflamação e alterações do metabolismo lipídico e ósseo em adolescentes e adultos com anemia falciforme.

Para facilitar o nosso estudo, nós lhe pedimos para responder algumas perguntas, como: nome, idade, endereço, bem como sobre a doença. Os únicos incômodos serão a punção de veia para coleta de sangue, que já é rotina no seguimento da anemia falciforme, e a realização do exame de imagem densitometria óssea.

Nós nos comprometemos a te informar os resultados dos exames e te orientar sobre o significado dos achados. Além de mantermos sigilo e confidencialidade sobre a sua participação nesse estudo.

Caso o senhor(a) não queira participar da pesquisa, saiba que isso não alterará o tratamento que vem sendo feito aqui no ambulatório de Hematologia HU-UFS, no entanto a sua participação é muito importante para nosso estudo, pois estará contribuindo para a evolução dos conhecimentos sobre a anemia falciforme e ajudando a todos os pacientes do serviço. A sua participação é voluntária e você poderá interrompê-la a qualquer momento, sem nenhum prejuízo para você.

Em caso de dúvida entre em contato conosco no local, dias e horários em que os atendimentos são realizados.

Diante do que foi dito, confirmo a minha participação:

Assinatura do paciente ou assinatura do responsável

Aracaju, ____ de _____ de ____.

Os investigadores principais, Dra Rosana Cipolotti (79 99981-1238) e Dra Ingrid Cristiane Pereira Gomes (79 99971-1437), comprometem-se a conduzir todas as atividades deste estudo de acordo com os termos do presente Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador responsável

Aracaju, ____ de _____ de ____.

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO eJHaem

Title Page

Association between sickle cell ulcer, inflammation and hemolysis.

Matheus Todt Aragao^{(1),(2)}, Nathalia Vasconcelos Barroso⁽¹⁾, Ingrid Cristiane Pereira Gomes⁽¹⁾, Francilene da Silva Amaral^{(1),(3)}

(1).Health Sciences Postgraduate Program, Sergipe Federal University, Aracaju, Sergipe, Brazil. (2).Medicine Department, Sergipe Federal University, Lagarto, Sergipe, Brazil. (3).Pharmacy Department, Sergipe Federal University, Aracaju, Sergipe, Brazil.

Matheus Todt Aragao - MD, Msc, Associate Professor, mtodt@hotmail.com

Nathalia Vasconcelos Barroso – RN, Msc, Associate Professor, nathytodt@gmail.com

Ingrid Cristiane Pereira Gomes – MD, Msc, Associate Professor, ingridcpg@yahoo.com.br

Francilene da Silva Amaral – PhD, Full Professor of Pharmacognosy, farmsilva@uol.com.br

Corresponding author: Matheus Todt Aragao. Paulo Afonso st, 222, Farolândia, 49032140, Aracaju, Sergipe, Brazil.

Phone: 55 79 99901-0099

E-mail: mtodt@hotmail.com

ORCID:<https://orcid.org/0000-0002-3585-4562>

Acknowledgments

The authors offers gratitude to the Sergipe Federal University that provided technical support for the development of this study. The authors of the manuscript declare that there was no financial support for the development of this work.

Conflict of Interest

The authors report no conflict of interest.

Data Sharing

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Abstract

Introduction: Musculoskeletal complications are a frequent cause of morbidity in patients with sickle cell anemia, with sickle cell ulcers being the most common diagnosis. Given the heterogeneity of data, we aimed to study the association between hemolysis, inflammation, and sickle cell ulcers. **Methods:** This was a cross-sectional study comparing patients with sickle cell anemia with and without leg ulcers. All patients were homozygous and the groups were matched for age, comorbidities, and medication use. Patients with a recent history of vaso-occlusive crisis, hospital admission, blood transfusion, or infectious and inflammatory diseases were excluded. The occurrence of ulcers, time of evolution, recurrence, hemolysis markers (hemoglobin, LDH, and bilirubin), and inflammatory markers (IL-1 β , 6, 8, 10 and TNF- α) were evaluated. **Results:** There was no statistically significant correlation between the levels of hemolysis and cytokine markers and the emergence or evolution of sickle cell ulcers. It is suggested that both hemolysis and inflammation play secondary roles in a complex multifactorial process and are not necessary for the development of lesions. **Conclusion:** The pathophysiology of skin ulcers is proposed to be complex and multifactorial, limiting the relevance of single laboratory markers to predict the occurrence of these lesions.

Key words: Leg Ulcer; Sickle Cell Anemia; Hemolysis; Inflammation

Introduction

Approximately 5% of the world's population has genetic mutations associated with hemoglobinopathies (1), with an estimated 25 million people affected by sickle cell anemia worldwide (2). In Brazil, up to 30,000 people have sickle cell anemia, with some estimates showing that this number can increase by up to 3,500 new cases per year, reaching a prevalence of 0.3% (3). These patients often have fatal musculoskeletal complications, with sickle cell ulcers being one of the most common (4), affecting up to 10% of patients with sickle cell anemia (5). Despite the high prevalence, these ulcers are frequently underdiagnosed and, consequently, treated inappropriately.

The etiology and pathophysiology of sickle cell ulcers are multifactorial, complex, and not fully characterized (6, 7). Similarly, data on its pathogenesis and risk factors are often contradictory (8). Although the exact cause of the occurrence and progression of sickle cell ulcers is still unknown, some authors have suggested that hemolysis and inflammation might be involved in their development.

Nolan et al. observed that patients with sickle cell anemia and leg ulcers had lower hemoglobin levels and higher levels of lactate dehydrogenase (LDH), bilirubin, transaminases, and reticulocytes than those without ulcers (9). Taylor et al. reported a higher frequency of leg ulcers among subjects with higher LDH levels (10). Cumming et al. reported LDH as a predictive marker of chronic ulcers in patients with sickle cell anemia (11). Minniti et al. found that patients with sickle cell ulcers had more intense hemolysis, including low hemoglobin levels, higher levels of reticulocytes, bilirubin, and AST, and above all, higher LDH levels than patients with sickle cell anemia without ulcers (12). More recently, Antwi-Boasiako et al. similarly suggested an association between ulcers and lower hemoglobin and higher total bilirubin levels (13). However, its controversy if the intravascular hemolysis is enough to explain the leg ulcers in patients with sickle cell disease (14).

The association between inflammation and sickle cell ulcers has been investigated in the literature. Bowers et al. proposed that IL-1 β , IL-10, and TNF- α may be associated with leg ulcers in patients with sickle cell anemia. However, the author emphasized that the association of these inflammatory markers with the lesions was

not conclusive (15). Da Silva et al. observed high levels of IL-6, IL-17A and IL-22, as well as high levels of LDH in patients with sickle cell ulcers (16). Domingos et al. emphasized the role of inflammation in the pathophysiology of sickle cell anemia, demonstrating an association between IL-8 levels and the occurrence of ulcers (17). Rego et al. showed elevated levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in patients with sickle cell ulcers (18). Recently, Belisário et al. reported that patients with leg ulcers had significantly higher levels of IL-8, IL-10 and IL-15 when compared to those without ulcers (19).

Given the heterogeneity of data on the pathogenesis of leg ulcers in patients with sickle cell anemia and the relevance of these lesions to patient survival, we aimed to investigate the association between hemolysis, inflammation, and the development and healing of skin ulcers associated with sickle cell anemia.

Methods

Study design

This was a cross-sectional study comparing patients with sickle cell anemia with and without a history of leg ulcers.

Participants

The study used a consecutive and convenient sample of patients registered at the hematology outpatient clinic of the University Hospital of Sergipe Federal University, a regional reference center. Patients were divided into two groups: those with sickle cell ulcers and those with sickle cell disease without a history of ulcers in the lower limbs. To minimize bias, the groups were matched for age, comorbidities, and medication use.

Patients with a diagnosis of sickle cell anemia and active leg ulcers, or a history of ulcers in the lower limbs were included in the group with sickle cell ulcers. Those with a diagnosis of sickle cell anemia with no history of ulcers were included in the group without sickle cell ulcers. To avoid confounding factors inherent to sickle cell disease activity and clinical stability of patients, the exclusion criteria described

by Ballas (20) were adopted: vaso-occlusive crises or infectious or inflammatory diseases in the last 4 weeks, hospitalization in the last 3 days, blood transfusions in the last 4 months, and antibiotic use in the last 3 weeks.

Test methods

Patients were evaluated through interviews using a structured questionnaire. For data conference and collection of additional information, patients' medical records were consulted. For leg ulcers, active lesions were examined, and information about the history of lesions in the lower limbs, affected limbs, maximum time of evolution, and number of recurrences was collected.

Peripheral venous blood was collected from the patients and the main hemolysis markers cited in the literature were promptly measured (9,10,11,12,21): serum hemoglobin, LDH, and total bilirubin. For inflammatory markers, plasma samples separated from the same blood sample were stored at -80 °C. Cytokines were measured using antibody-based immunoassays and protein quantification panels using the Luminex and Procarta Plex platforms (Thermo Fisher Scientific). This kit can measure pro-inflammatory cytokines produced by Th1 cells involved in innate immunity (IL-1 β , IL-8, and TNF- α), pro-inflammatory cytokines produced by Th17 cells (IL-6), and anti-inflammatory cytokines (IL-10).

Analysis

Descriptive statistics and association analyses were used in this study. Associations were evaluated using the chi-square test and Student's t-test for parametric variables and the Mann–Whitney test for non-parametric variables; statistical significance was set at $p=0.05$. The effect size was also estimated using the rank-biserial correlation test and Cohen's d test.

Ethical aspects

The study was approved by the Ethics and Research Committee of Sergipe Federal University (approval number: 2,897,835). All patients had the right to withdraw from the study at any time, regardless of the reason. Absolute confidentiality

was guaranteed regarding the data collected and participants' full access to their medical records.

Results

Initially, 53 patients who met the established criteria were enrolled; however, due to sample losses, only 19 patients with sickle cell ulcers and 13 patients without ulcers were included. Despite de publications indicating that up to 10% of patients with sickle cell anemia will present leg ulcers, these patients are often underdiagnosed, which makes tracking these cases very difficult. The group of patients with sickle cell ulcers comprised 10 (52.63%) male patients, with a mean age of 27 years (19–34 years), all self-declaring as black or afro-descendant. No patient reported or presented with any other medical condition which could cause chronic ulcers of the lower limbs. All patients regularly took folic acid at 5 mg/day, and 12 (63.15%) also took hydroxyurea at 20–35 mg/kg/day. Eleven patients (57.89%) had a history of ulcer in only one leg, and the average maximum duration of the lesion was 18 months (0.25–84 months); nine (47.37%) patients reported recurrence of the lesions, and eight (42.11%) had more than one relapse.

The group of patients without a history of ulcers comprised five (38.46%) male patients, with a mean age of 28.15 years (21–38 years), all self-reported as black or afro-descendant. Regarding medication use, 12 (92.30%) patients were taking folic acid at 5 mg/day, and 10 (76.92%) were also taking hydroxyurea at 20–35 mg/kg/day.

Mean hemoglobin levels among patients with ulcers was 8.81 g/dL, while among individuals without ulcers was 9.11 g/dL ($p=0.49$). Among patients with ulcerative lesions, the mean LDH level was 1,014 IU/L, and among patients without lesions, it was 740.54 IU/L ($p=0.21$). Finally, mean total bilirubin levels among patients with ulcers and those without ulcers were 3.92 mg/dL and 2.45 mg/dL, respectively ($p=0.12$). None of these differences were statistically significant (**Table 1**). According to the rank-biserial correlation test, there was a low correlations between the occurrence of ulcers and lower hemoglobin levels (15.0%), higher LDH levels (27.1%), and higher bilirubin levels (32.8%).

When the hemolysis markers and the duration of ulcer were compared, a statistically significant correlation was observed between a longer duration of active ulceration and lower hemoglobin levels ($p=0.025$), higher LDH levels ($p=0.015$), and higher bilirubin levels ($p=0.009$). There was a statistically significant correlation between the number of relapses and higher LDH levels ($p=0.023$). No statistically significant correlation was observed between lesion recurrence, lower hemoglobin levels, and higher bilirubin levels (**Graph 1**).

The pro-inflammatory cytokine IL-1 β had a mean concentration of 6.47 pg/mL in patients with ulcers and 4.51 pg/mL in those without ulcers ($p=0.16$). The mean concentration of the pro-inflammatory cytokine IL-8 was 0.03 pg/mL among patients with ulcers and 0.26 pg/mL among those without lesions ($p=0.20$). The Th17-related pro-inflammatory cytokine, IL-6, presented a mean concentration of 48.03 pg/mL in patients with lesions and 34.25 pg/mL in those without lesions ($p=0.11$). TNF- α showed a mean concentration of 40.86 pg/mL among patients with ulcers and 28.29 pg/mL among those without ulcers ($p=0.30$). The anti-inflammatory cytokine IL-10 showed a mean concentration of 3.61 pg/mL among patients with ulcerative lesions and 2.71 pg/mL among patients without ulcers ($p=0.15$). None of the above mentioned differences were statistically significant (**Table 1**). According to the Cohen's d test, moderate correlations were observed between the occurrence of ulcers and higher IL-1 β (52.8%), IL-6 (60.4%), and IL-10 (53.0%) plasma levels. According to the rank-biserial correlation test, only a weak correlation was observed between the occurrence of ulcers and higher IL-8 (22.0%) and TNF- α levels (22.6%).

When the relationship between inflammatory markers and the time of active ulceration was analyzed, no statistically significant relationship was found between plasma cytokine levels and the time of ulcer occurrence. Regarding the relationship between inflammatory markers and ulcer recurrence, a significant relationship was observed only between the risk of relapse and IL-6 plasma levels ($p=0.046$) (**Graph 2**).

Discussion

We found no statistically significant correlation between the levels of hemoglobin, LDH, total bilirubin, and the occurrence of ulcers. According to the rank-biserial test, low correlations were observed between the levels of hemoglobin, LDH, total bilirubin, and ulcer formation. Evaluating the relationship between hemolysis and time of active ulceration, a significant correlation was observed between hemoglobin, LDH, total bilirubin, and time of active ulceration. Regarding the relationship between hemolysis and recurrence, a statistically significant correlation was noted only between LDH, total bilirubin, and ulcer recurrence.

Although the literature reviewed in this study shows an association between the degree of hemolysis and the occurrence of sickle cell ulcers, the findings are heterogeneous and often do not consider the bias of sickle cell disease activity. Nolan et al. observed that patients with sickle cell ulcers had more severe hemolysis with higher levels of reticulocytes, LDH, bilirubin, and AST (9). Connes et al. reported that patients with recurrent leg ulcers had higher levels of LDH and lower hemoglobin levels than patients without a history of ulcers (21). Minitti et al. observed that patients with ulcers have low levels of hemoglobin, in addition to higher reticulocyte, bilirubin, AST, and LDH levels than patients with sickle cell anemia without ulcers (12). Dubert et al. observed a significant correlation only between ulcers and hemoglobin levels after adjusting for sex, age, and sickle cell phenotype (22). Olatunya et al., despite suggesting that hemolysis could have an important role in the pathophysiology of the leg ulcers, said that intravascular hemolysis may not be enough to explain these ulcers (14).

The correlation between hemolysis intensity and various complications of sickle cell anemia is well-documented, but this correlation is not well-established for sickle cell ulcers specifically. In this study, no significant correlation was observed between the hemolysis markers analyzed and the occurrence of ulcers; however, a relationship was noted between lower levels of hemoglobin and a longer duration of active ulceration, while higher levels of bilirubin and LDH were correlated with a longer duration of ulcer and a greater number of relapses. It has been proposed that hemolysis may be associated with the formation of sickle cell ulcers; however, it is not a fundamental factor involved in their occurrence, limiting the validity of laboratory markers of hemolysis as predictors of leg ulcers in patients with sickle cell anemia.

When evaluating the association between ulcers and inflammation, there was no statistically significant correlation between the levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and the occurrence of sickle cell ulcers. According to Cohen's d test, only moderate correlations were observed between the occurrence of ulcers and the levels of the cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-10. According to the rank-biserial test, weak correlations were observed between ulcers, IL-8, and TNF- α . There was no significant association between the markers of inflammation measured and the time of active lesion, with a correlation being observed only between higher IL-6 levels and relapses.

The association between inflammation and sickle cell ulcers has been investigated in the literature, but the results have been inconsistent. Bowers et al., when evaluating patients with sickle cell disease and ulcers, proposed that IL-1 β , IL-10, and TNF- α may be associated with ulcers. However, the author emphasized that the association of these inflammatory markers with the lesions is not conclusive (15). Da Silva et al. reported elevated levels of IL-6, IL-17A, and IL-22 in patients with sickle cell and leg ulcers (16). Similarly, Domingos et al. demonstrated an association between IL-8 levels and the occurrence of ulcers (17). Rego et al. observed higher levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, in patients with sickle cell ulcers (18). More recently, Belisário et al. reported that patients with leg ulcers had significantly higher levels of IL-8, IL-10 and IL-15 (19).

Although a correlation between inflammatory markers and the occurrence of sickle cell ulcers has been reported, this association is not conclusive. After studying a sample matched for age, comorbidities, and medication use and excluding the main confounding factors (such as the use of blood products, vaso-occlusive crises, and clinical instability), no statistically significant correlation between pro-inflammatory or anti-inflammatory cytokines and the emergence of sickle cell ulcers was found. This finding points to the uncertain nature of these lesions in which inflammatory phenomena probably do not play a fundamental role.

It has been proposed that both hemolysis and inflammation are factors involved in a more complex multifactorial mechanism of sickle cell ulcer formation. Like other chronic ulcers, such as those in diabetic patients, it has been proposed that sickle cell ulcers result from the interaction of multiple factors involving not only he-

molytic activity and inflammatory imbalance but also venous insufficiency, bacterial infections, peripheral neuropathy and impairment of the skin barrier related to genetic factors. The absence of one of the factors involved in the pathophysiology of the lesions would not rule out the occurrence of sickle cell ulcers. Therefore, the isolated use of hemolysis and inflammation markers as predictors of the occurrence and healing of these lesions is potentially limited.

Conclusion

There was no statistically significant correlation between hemolysis and cytokine markers and ulcers. Both hemolysis and inflammation have been suggested to play secondary roles in the complex and multifactorial etiopathogenesis of sickle cell ulcers. Therefore, the relevance of hemolysis and inflammation markers as predictors of these lesions appears to be limited.

References

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sickle-cell disease and other hemoglobin disorders; 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs308/en/>. Accessed February 20, 2022.
2. REES DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2010;376(9757):2018-31. DOI:10.1016/S0140-6736(10)61029-X.
3. HOKAZONO M, Silva GS, Silva EMK, Braga JAP. Results from transcranial Doppler examination on children and adolescents with sickle cell disease and correlation between the time-averaged maximum mean velocity and hematological characteristics: a cross-sectional analytical study. *São Paulo Med J*. 2020;129(3):134-8. <https://doi.org/10.1590/S1516-31802011000300003>.
4. FELIX AA, Souza HM, Ribeiro SBF. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(3):203-8. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010005000072>.
5. ONYEMAECHI NO, Enweani UN, Maduka CO. Musculoskeletal complications of sickle cell disease in Enugu, Nigeria. *Niger JMed*. 2011;20(4):456-62. PMID: 22288323.
6. MOHAN JS, Marshall JM, Reid HL, Thomas PW, Serjeant GR. Postural vasoconstriction and leg ulceration in homozygous sickle cell disease. *Clin Sci*. 1997;92(2):153-8. DOI:10.1042/cs0920153.
7. DE CARVALHO-SIQUEIRA GQ, Ananina G, Souza BB, Borges MG, Ito MT, Silva-Costa SM, Domingos IF, Falcão DA, Lopes-Cendes I, Bezerra MAC, Araujo AS, Lucena-Araujo AR, Gonçalves MS, Saad STO, Cotsa FF, Melo MB. Whole-exome sequencing indicates FLG2 variant associated with leg ulcers in Brazilian sickle cell anemia patients. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2019 Aug;244(11):932-9. DOI:10.1177/1535370219849592.
8. HALABI-TAWIL M, Lionnet F, Girot R, Bachmeyer C, Levy PP, Aractingi S. Sickle cell leg ulcers: a frequently disabling complication and a marker of severity. *Br J Dermatol*. 2008 Feb;158:339-44. DOI:10.1111/j.1365-2133.2007.08323.x.
9. NOLAN VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Ma Q, Wyszynski DF, Farrel JJ, Sebastiani P, Farrer LA, Steinberg MH. Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF- β BMP pathway. *Br J Haematol*. 2006 Jun;133(5):570-8. DOI:10.1111/j.1365-2141.2006.06074.x.
10. TAYLOR JG, Nolan VG, Mendelsohn L, Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. *PLoS One*. 2008;3(5):e2095. DOI:10.1371/journal.pone.0002095.
11. CUMMIG V, King L, Fraser R, Serjeant G, Reid M. Venous incompetence, poverty and lactate dehydrogenase in Jamaica are important predictors of leg ulceration in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2008 Jul;142(1):119-25. DOI:10.1111/j.1365-2141.2008.07115.x.
12. MINNITI CP, Delaney KMH, Gorbach AM, Xu D, Lee CCR, Malik N, Koroulakis A, Antalek M, Maivelett J, Pertes-Lawrence M, Movelli EM, Lanzkron SM, Axelrod KC,

Kato GJ. Vasculopathy, inflammation, and blood flow in leg ulcers of patients with sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 2014 Jan;89(1):1-6. DOI:10.1002/ajh.23571.

13.ANTWI-BOASIAKO C, Andemariam B, Colombatti R, Asare EV, Strunk C, Piccone CM, Manwani D, Boruchov D, Farooq F, Urbonya R, Wilson S, Boatemaa GD, Perrotta S, Sainati L, Rivers A, Rao S, Zempsky W, Ekem I, Sey F, Segbefia C, Inusa B, Tartaglione I, Campbell AD. A study of the geographic distribution and associated risk factors of leg ulcers within an international cohort of sickle cell disease patients: the CASiRe group analysis. *Ann Hematol.* 2020 Sep;99(9):2073-9. DOI:10.1007/s00277-020-04057-8.

14.OLATUNYA OS, Lanaro C, Longhini AL, Penteado CFF, Fertrin KY, Adekile A, Saad STO, Costa FF. Red blood cells microparticles are associated with hemolysis markers and may contribute to clinical events among sickle cell disease patients. *Ann Hematol.* 2019 Nov;98(11):2507-21. DOI:10.1007/s00277-019-03792-x.

15.BOWERS AS, Reid HL, Greenidge A, Landis C, Reid M. Blood viscosity and the expression of inflammatory and adhesion markers in homozygous sickle cell disease subjects with chronic leg ulcers. *PLoS One.* 2013 Jul 26;8(7):e68929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068929>.

16.DA SILVA RR, Pereira MC, Melo Rêgo MJ, Domingues Hatzlhofer BL, da Silva Araújo A, Cavalcanti Bezerra MA, da Rocha Pitta I, da Rocha Pitta MG. Evaluation of Th17 related cytokines associated with clinical and laboratorial parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine.* 2014 Feb;65(2):143-7. DOI:10.1016/j.cyto.2013.11.012.

DE CARVALHO-SIQUEIRA GQ, Ananina G, Souza BB, Borges MG, Ito MT, Silva-Costa SM, Domingos IF, Falcão DA, Lopes-Cendes I, Bezerra MAC, Araujo AS, Lucena-Araujo AR, Gonçalves MS, Saad STO, Cotsa FF, Melo MB. Whole-exome sequencing indicates FLG2 variant associated with leg ulcers in Brazilian sickle cell anemia patients. *Exp Biol Med (Maywood).* 2019 Aug;244(11):932-9. DOI:10.1177/1535370219849592.

17.DOMINGOS I, Pereira-Martins D, Sobreira M, Oliveira R, Alagbe A, Lanaro C, Albuquerque D, Blotta M, Araujo A, Costa F, Lucena-Araujo A, Sonati M, Bezerra MAC, Santos M. High levels of proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8 are associated with a poor clinical outcome in sickle cell anemia. *Ann Hematol.* 2020 May;99(5):947-53. DOI:10.1007/s00277-020-03978-8.

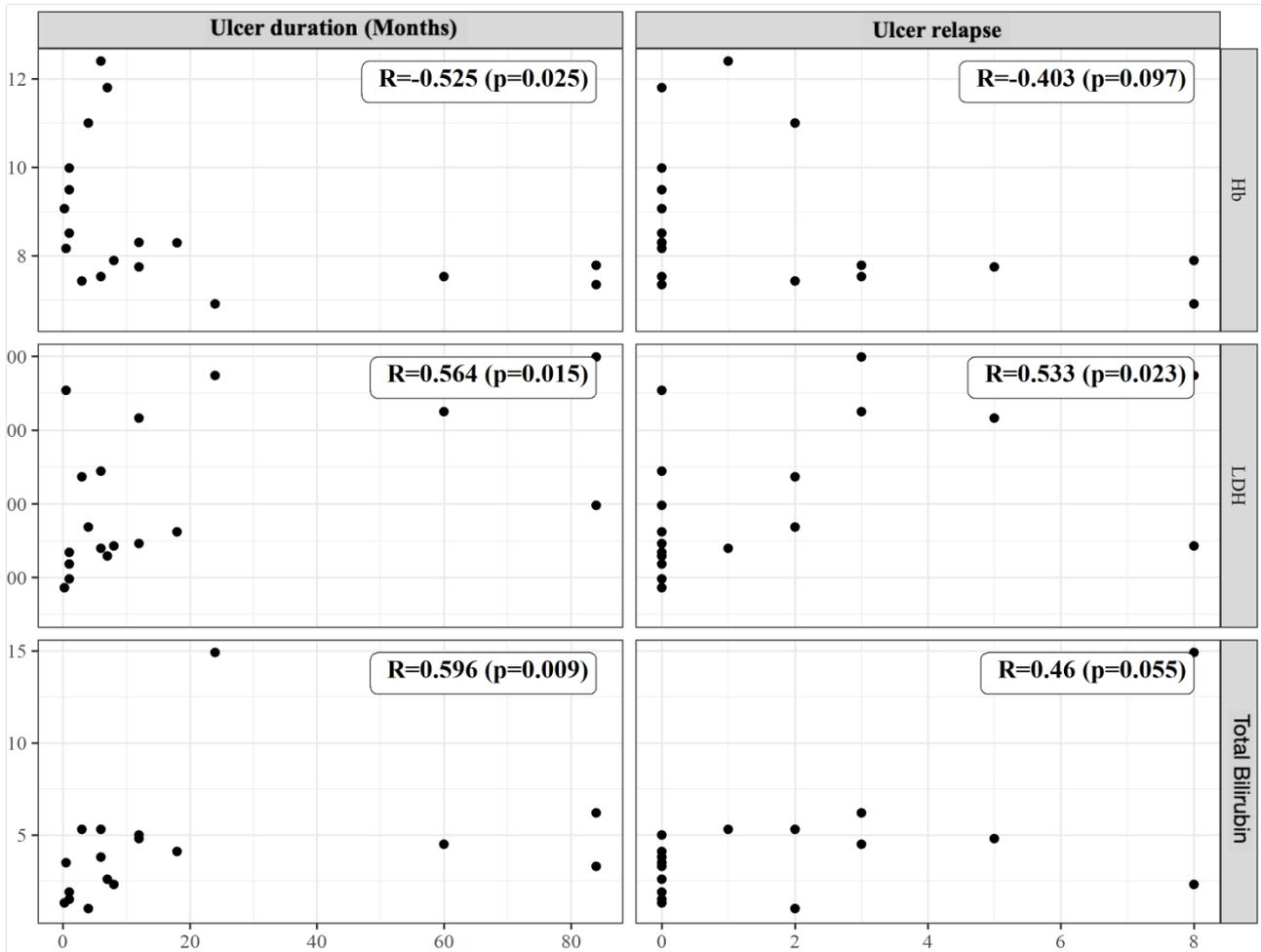
18.REGO MJ, da Silva RR, Pereira MC, da Silva Araújo A, Pitta Ida R, Falcão DA, Bezerra MA, Pitta MG. Evaluation of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T cell populations, IL-10 production, and their correlation with clinical and biochemical parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine.* 2015 Oct;75(2):310-5. DOI:10.1016/j.cyto.2015.07.016.

19.BELISÁRIO AR, Mendes-Oliveira F, de Souza VR, Bolina-Santos E, Mendes FG, Moreno EC, Franca AT, Sabino EC, Otta DA, de Faria ES, Coelho-Dos-Reis JGA, Martins-Filho OA, Carneiro-Proietti AB. Association between inflammatory molecules, nitric oxide metabolites and leg ulcers in individuals with sickle cell anemia. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2022 Apr-Jun;44(2):169-76. DOI:10.1016/j.htct.2020.09.152.

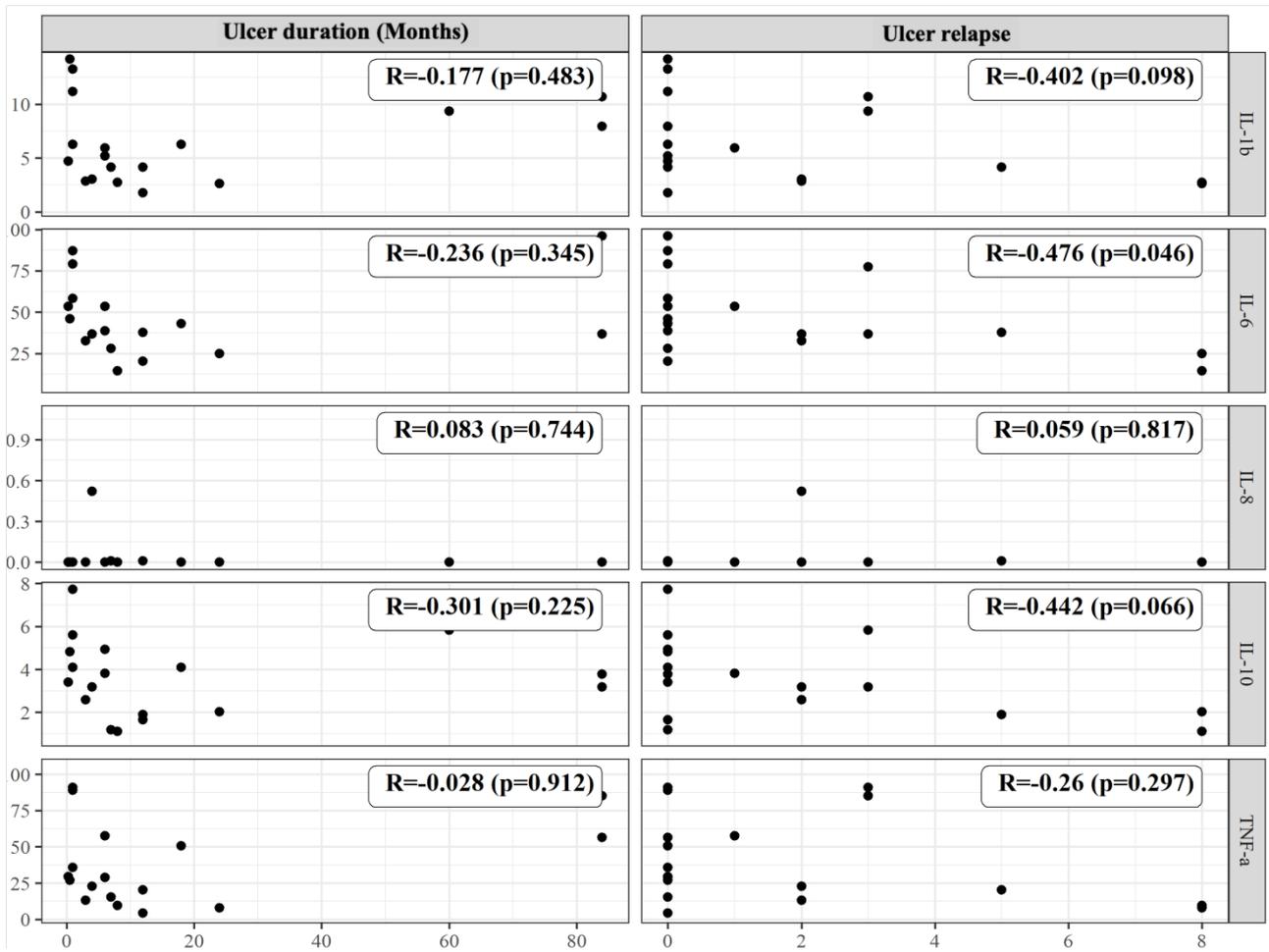
20.BALLAS Ballas SK. More definitions in sickle cell disease: steady state v base line data. *Am J Hematol.* 2012 Mar;87(3):338. DOI:10.1002/ajh.22259.

21. CONNES P, Lamarre Y, Hardy-Dessources MD, Lemonne N, Waltz X, Mougénel D, Mukisi-Mukaza M, Lalanne-Mistrih ML, Tarer V, Tressières B, Etienne-Julan M, Romana M. Decreased hematocrit-to-viscosity ratio and increased lactate dehydrogenase level in patients with sickle cell anemia and recurrent leg ulcers. *PLoS One*. 2013 Nov 4;8(11):e79680. DOI:10.1371/journal.pone.0079680.
22. DUBERT M, Elion J, Tolo A, Diallo DA, Diop S, Diagne I, Sanogo I, Belinga S, Guifo O, Wamba G, Ngo Sack F, Boïdy K, Kamara I, Traore Y, Diakite CO, Gbonon V, Faye BF, Seck M, Deme Ly I, Chelo D, N'Guetta R, Diop IB, Gaye B, Jouven X, Ranque B. Degree of anemia, indirect markers of hemolysis, and vascular complications of sickle cell disease in Africa. *Blood*. 2017 Nov 16;130(20):2215-23. DOI:10.1182/blood-2016-12-755777.
23. KATO GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, Gladwin MT. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *Am J Hematol*. 2009 Sep;84(9):618-25. DOI:10.1002/ajh.21475.
24. SENET P, Blas-Chatelain C, Levy P, Manea EM, Peschanski M, Mirault T, Stankovic-Stojanovic K, Debure C, Debbache K, Girot R, Bureau JM, Bachmeyer C, Baldeschi C, Galacteros F, Lionnet F, Gellen-Dautremer J. Factors predictive of leg-ulcer healing in sickle cell disease: a multicentre, prospective cohort study. *Br J Dermatol*. 2017 Jul;177(1):206-11. DOI:10.1111/bjd.15241.
25. ADEDEJI MO, Emokpare CI. Bacteriology of sickle-cell leg ulcers in the equatorial forest belt of South-Western Nigeria. *J Trop Med Hyg*. 1987 Dec;90(6):297-300. PMID: 3323544.
26. SINGH AP, Minniti CP. Leg Ulceration in Sickle Cell Disease: An Early and Visible Sign of End-Organ Disease. In: Inusa, B. P. D. , editor. *Sickle Cell Disease - Pain and Common Chronic Complications* [Internet]. London: IntechOpen. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/51543>. DOI:10.5772/64234.
27. MOHAN JS, Vigilance JE, Marshall JM, Hambleton IR, Reid HL, Serjeant GR. Abnormal venous function in patients with homozygous sickle cell (SS) disease and chronic leg ulcers. *Clin Sci (Lond)*. 2000 Jun;98(6):667-72. PMID:10814603..
28. PALADINO SF. Ulceras de membros inferiores na anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(3):188-90. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000300019>.

Graphs and Tables



Graph 1. Correlation between hemolysis markers, active ulcer time and number of relapses.



Graph 2. Correlation between inflammatory markers, time of active ulcer and number of relapses.

Table1. Correlation between hemolysis markers, inflammation markers and occurrence of sickle cell ulcers.

| | ULCER | | | | p | TE |
|-------------------|---------------|---------------------|----------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| | Yes | | No | | | |
| | Average (DP) | Median (IIQ) | Average (DP) | Median (IIQ) | | |
| Hb | 8,81 (1,59) | 8,29 (7,52-9,98) | 9,11 (1,45) | 9,05 (8,07-10,26) | 0,490 _W | -0,15 _B |
| DHL | 1014 (516,01) | 810 (646-1581) | 740,54 (289,2) | 698 (554,5-904,5) | 0,210 _W | 0,271 _B |
| BILI TOTAL | 3,92 (3,1) | 3,5 (1,9-5) | 2,45 (1,13) | 2,6 (1,45-2,8) | 0,120 _W | 0,328 _B |
| IL-1b | 6,47 (3,82) | 5,57 (3-9,71) | 4,51 (3,59) | 3,42 (1,82-6,74) | 0,160 _T | 0,528 _D |
| IL-6 | 48,03 (23,49) | 40,84 (31,55-63,13) | 34,25 (22,13) | 34,3 (18,25-37,71) | 0,110 _T | 0,604 _D |
| IL-8 | 0,03 (0,12) | 0 (0-0) | 0,26 (0,42) | 0 (0-0,63) | 0,200 _W | -0,22 _B |
| IL-10 | 3,61 (1,76) | 3,59 (1,99-4,85) | 2,71 (1,62) | 2,09 (1,59-3,75) | 0,150 _T | 0,53 _D |
| TNF-a | 40,86 (30,62) | 29,16 (14,91-64,56) | 28,29 (26,27) | 22,71 (11,67-33,95) | 0,300 _W | 0,226 _B |

Legend: Hb - Hemoglobin. DHL - Lactate Dehydrogenase. Bili Total - Total Bilirubin. IL - Interleukin. TNF-a - Tumor Necrosis Factor. DP – Standart Deviation. IIQ – Interquartile Range. W – Mann-Whitney Test. T – t Test. TE – Effect Size. B – Rank Biserial Test. D – Cohen's d Test.