

Título: Impacto E Agravantes Da Dor Crônica Nas Doenças Falciformes: Resultados Da Análise De Questionários Promis® E Do Perfil Metabolômico De Pacientes Adultos Brasileiros

Palavras-Chave: DOENÇA FALCIFORME, QUALIDADE DE VIDA, METABOLÔMICA

Autores(as):

Lucas Bibiano de Oliveira Souza, HEMOCENTRO – UNICAMP

Thaís Bonon Assis, IB - UNICAMP

Adriana da Silva Santos, HEMOCENTRO – UNICAMP

Audrey Basso Zangirolami, HEMOCENTRO – UNICAMP

Rogério Torres Seber, IB - UNICAMP

Sara Teresinha Olalla-Saad, HEMOCENTRO – UNICAMP

Prof. Dr. Bruno Deltreggia Benites, HEMOCENTRO – UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

As Doenças Falciformes (DF) representam um importante problema de saúde pública que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, sendo responsáveis por considerável morbidade e mortalidade entre crianças e adultos. (1) A mutação que dá origem à hemoglobina S, característica desse grupo de doenças, faz com que essa molécula seja altamente suscetível à polimerização quando em sua forma desoxigenada, alterando a forma das hemácias com maior tendência à oclusão de pequenos vasos, hemólise, e suas posteriores consequências. (2) O fardo da doença varia de crises dolorosas agudas ao comprometimento crônico de vários órgãos, levando a considerável perda de qualidade de vida. A manifestação central da doença são crises dolorosas agudas secundárias à isquemia tecidual desencadeada por essas micro obstruções na circulação periférica. (3) Contudo, observa-se que, conforme vão sucedendo os episódios de vaso oclusão com dor aguda, muitos desses indivíduos não retornam ao seu estado basal pré-crise, com permanência de dor residual entre os episódios, e que progressivamente vai aumentando de intensidade, estabelecendo, então um quadro de dor crônica persistente e incapacitante. (4) Dados de modelo animal mostram que isso deve ocorrer por mecanismos moleculares que incluem tanto a sensibilização nociceptiva periférica quanto a modulação de circuitos neuronais cerebrais. (5)

Apesar do conhecimento crescente sobre a fisiopatologia das complicações da doença e a observação direta, por parte das equipes de assistência, de seu impacto sobre a qualidade de vida, dados objetivos sobre a dimensão desse impacto ainda são escassos, principalmente no contexto brasileiro. Portanto, cresce a importância das avaliações mais pormenorizadas desses desfechos reportados pelos próprios pacientes (PROM – Patient-reported outcome measures) em nossa população específica. (6) Essas ferramentas consistem de questionários averiguando informações de desfechos de saúde coletados diretamente dos pacientes, incluindo avaliação de sintomas, qualidade de vida e status funcional. Inicialmente desenhados como ferramentas de uso em pesquisa clínica, em muitas situações já foram incorporados dentro da assistência médica padrão e utilizados como medida de eficácia do serviço prestado. Um dos mais conhecidos e utilizados desses instrumentos é o Patient-Reported Outcomes Measurement Information System (PROMIS), elaborado pelo National Institutes of Health (NIH), dos Estados Unidos. (7)

As ciências ômicas compreendem os estudos que visam a identificação do máximo de biomoléculas presentes em fluidos, células, tecidos ou organismos, objetivando compreender os padrões e/ou alterações biológicas entre os sistemas biológicos estudados. A metabolômica, em particular, é uma análise comparativa entre os grupos de estudo que busca diferenciá-los a partir do perfil de seu metaboloma, ou seja, do seu conjunto de metabólitos de baixa massa molecular (8). Pode ser classificada em duas principais abordagens, sendo elas: a metabolômica alvo (do inglês, *targeted metabolomics*), que busca identificar e/ou quantificar um metabólito ou uma classe específica de metabólitos pré-definidos de rotas metabólicas específicas, e a metabolômica global ou não direcionada (do inglês, *untargeted metabolomics*), baseada na análise qualitativa ou semi-quantitativa do maior número possível de metabólitos de diversas classes que estejam presentes em um sistema biológico (9,10,11). O fluxo de trabalho em metabolômica, embora possua particularidades de acordo com o objetivo da mesma, apresenta, de modo geral, as seguintes etapas: definição do problema biológico a ser estudado e desenho experimental, amostragem e preparo de amostra, análise instrumental e aquisição de dados, processamento de dados e análise estatística, identificação e/ou quantificação de metabólitos e, por fim, interpretação biológica (9).

Neste projeto, objetivou-se traçar o perfil de acometimento e estudar o impacto da dor crônica na saúde mental e qualidade de vida de pacientes adultos com DF, e, paralelamente, buscar identificar moléculas envolvidas na sua ocorrência, com o objetivo de gerar prospecção de novos alvos terapêuticos.

2. METODOLOGIA

Pacientes com diagnóstico de DF em seguimento no Hemocentro UNICAMP foram convidados para participação no estudo, de forma sequencial, durante as consultas de rotina, e incluídos após consentimento e assinatura do TCLE (aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa, parecer número: 62920422.0.0000.5404). Os participantes foram então divididos em 2 grupos – com ou sem dor crônica – a partir de informações presentes nos prontuários eletrônicos, dos quais também foram coletados dados hospitalares, hematimétricos e sociodemográficos. Os pacientes completaram as versões curtas para adultos das medidas PROMIS para saúde global (v1.2), depressão (8a v1.0), ansiedade (8a v1.0) e interferência na dor (6b v1.1). As medidas PROMIS consistem em seis a oito itens pedindo aos entrevistados que avaliem em uma escala *Likert* e são relatados como *T scores* referenciadas à população geral dos EUA, sendo que um número mais alto indica maior presença da característica. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais foram resgatados de prontuário médico para buscar possíveis relações com os *T scores* dos PROMIS. Para as análises estatísticas, foi utilizado teste de correlação de Pearson para avaliação de correlações entre as variáveis contínuas, e o teste t de Student para avaliação das diferenças entre os grupos (com e sem dor crônica), sendo os resultados considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Em paralelo, amostras plasmáticas desses pacientes, e de um grupo de controles saudáveis, foram submetidas a análise de perfil metabolômico por Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (UHPLC-HRMS) nos modos positivos e negativos para ionização de eletrospray (ESI+/ESI-). Esse equipamento gerou *features* de possíveis marcadores moleculares. As *features* foram analisadas através do Metaboanalyst 6.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram incluídos 43 pacientes, com mediana de idade de 43 anos (15-78), sendo 27 (63%) do sexo feminino, com os genótipos: 25 HbSS, 08 HbSC, 7 Sbeta-talassemia e 3 HbSD.

Comparando-se os indivíduos de acordo com a presença ou não de dor crônica: indivíduos com dor crônica têm maior mediana de idade (39.3 x 48.7, $p = 0.026$), maiores níveis de Hb (9,9 x 8,7, $p=0.038$), menores contagens leucocitárias totais (6.35 x 7.68, $p=0.04$), mas sem diferenças significativas nos resultados dos testes PROMIS. Entretanto, a ocorrência de pelo menos uma crise vasooclusiva (CVO) nos últimos 6 meses ou o diagnóstico de necrose óssea avascular tiveram relação estatisticamente significativa com piores resultados nos 3

domínios PROMIS testados. Além disso, quanto menor a renda dos pacientes, pior o impacto da dor na vida diária ($r=-0,46$, $p<0,001$).

Em relação às análises por UHPLC-MS, no modo positivo, um total de 107 features apresentaram $VIP > 1$ e 126 apresentaram $p < 0,05$ e $FC > 1,5$, sendo 48 mais intensos no grupo controle e 78 no grupo de pacientes. Já no modo negativo, foram 98 features com $VIP > 1$ e 105 com $p < 0,05$ e $FC > 1,5$ (53 relacionados com o grupo controle e 52 relacionados com o grupo de pacientes). Já na comparação dos grupos com e sem dor crônica no modo positivo, um total de 153 features apresentaram $VIP > 1$ e 103 apresentaram $p < 0,05$ e $FC > 1,5$, sendo 25 mais intensos no grupo sem dor crônica e 78 no grupo com dor crônica. Já no modo negativo, foram 157 features com $VIP > 1$ e 52 com $p < 0,05$ e $FC > 1,5$ (50 relacionados com o grupo sem dor crônica e 7 relacionados com o grupo com dor crônica).

Das moléculas diferenciadas inicialmente, foi possível identificar, 34 possíveis biomarcadores: relacionados ao grupo controle, foram encontrados leucotrienos, ceramidas de fosfolinas e outros; ao grupo de pacientes foram identificados bilirrubinas, endocanabinóides (agonistas do sistema endocanabinóide e ligados ao ácido eicosapentaenoico), glicerosfosfolinas, glicerosfosfoetanolaminas e outros. No grupo de pacientes, aqueles classificados como não possuindo dor crônica, apresentaram maiores quantidades de endocanabinóides ((2-Arachidonoylglycerol e 2-Eicosapentaenoyl-glycerol), bilirrubinas, derivados da vitamina D e glicerosfosferinas. Por fim, relacionados ao grupo com dor crônica, os compostos identificados foram uma glicerosfosfolina (lisoplasménilcolina) e um ácido graxo (ácido adrênico).

4. CONCLUSÕES

Este é o primeiro trabalho que buscou analisar o perfil de saúde mental dos pacientes falciformes brasileiros através da ferramenta PROMIS, gerando a possibilidade de traçar um perfil psicossocial dessa população. Nesta coorte de pacientes brasileiros, demonstrou-se que a ocorrência de crises vasooclusivas agudas, o diagnóstico de necrose óssea e baixa renda estão relacionados aos piores índices de ansiedade, depressão e interferência da dor na vida diária.

Este é o primeiro trabalho empregando UHPLC-HRMS para análise exploratória de metabólitos envolvidos em dor crônica nas DFs, identificando potenciais alvos terapêuticos a serem explorados em futuros ensaios clínicos. A maior expressão de moléculas do sistema endocanabinóide pode indicar um fator de proteção nos pacientes que não são acometidos por dor crônica. Já nos pacientes com dor crônica, o aumento de ácido adrênico pode estar associado a maior ocorrência de ferroptose, mecanismo já descrito como envolvido no desenvolvimento de dor neuropática; e lisoplasménilcolina é liberada em resposta a hipóxia e geração de trombina, e aumenta a adesividade celular ao endotélio, revelando possíveis mecanismos microvasculares associados a maior ocorrência de dor.

O estudo demonstra a necessidade de investimentos contínuos em saúde pública que atendam a essa população de pacientes, evitando a ocorrência de complicações que impactam na qualidade de vida, mas também salienta a importância das condições socioeconômicas como fatores agravantes de manifestação clínica. Além disso, sinaliza a associação de determinadas vias moleculares com a ocorrência de dor crônica, que precisam ser avaliadas de forma pormenorizada em novos estudos, ampliando tanto o conhecimento sobre essa condição quanto abrindo possibilidades de busca de novas terapias.

5. BIBLIOGRAFIA

1. van Tuijn CFJ, Schimmel M, van Beers EJ, Nur E, Biemond BJ. Prospective evaluation of chronic organ damage in adult sickle cell patients: A seven-year follow-up study. *Am J Hematol*. 2017 Oct;92(10):E584–90.
2. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018;4:1–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.10>
3. Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol*. 2002 Mar;9(2):101–6.
4. Brandow AM, DeBaun MR. Key Components of Pain Management for Children and Adults with Sickle Cell Disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018 Jun;32(3):535–50.
5. Sagi V, Song-Naba WL, Benson BA, Joshi SS, Gupta K. Mouse Models of Pain in Sickle Cell Disease. *Curr Protoc Neurosci*. 2018 Oct;85(1):e54.
6. Osunkwo I, Andemariam B, Minniti CP, Inusa BPD, El Rassi F, Francis-Gibson B, et al. Impact of sickle cell disease on patients' daily lives, symptoms reported, and disease management strategies: Results from the international Sickle Cell World Assessment Survey (SWAY). *Am J Hematol*. 2021 Apr;96(4):404–17.
7. Cella D, Yount S, Rothrock N, Gershon R, Cook K, Reeve B, et al. The Patient-Reported Outcomes Measurement Information System (PROMIS): progress of an NIH Roadmap cooperative group during its first two years. *Med Care*. 2007 May;45(5 Suppl 1):S3–11.
8. Fiehn, Oliver. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and functional genomics*. 2001, Vol. 2.
9. Canuto, Gisele AB et al. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Química Nova*. 2018, Vol. 41.
10. Yan, Min and Xu, Guowang. Current and future perspectives of functional metabolomics in disease studies - A review. *Analytica Chimica Acta*. 2018, Vol. 1037.
11. Gonzalez-Dominguez., Alvaro et al. An overview on the importance of combining complementary analytical platforms in metabolomic research. . *Current topics in medicinal chemistry*. 30, 2017, Vol. 17.