



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À HEMATOLOGIA



AVALIAÇÃO DO PERFIL DE BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS NO PERFIL
CLÍNICO DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

ALEXANDER LEONARDO SILVA JUNIOR

MANAUS

2021

ALEXANDER LEONARDO SILVA JUNIOR

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS NO PERFIL
CLÍNICO DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de *Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia*.

Orientador (a): Dra. Adriana Malheiro Alle Marie.

Coorientador (a): Dr. Erich Vinicius de Paula.

MANAUS

2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

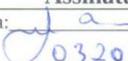
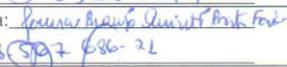
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

S586a	<p>Silva Junior, Alexander Leonardo</p> <p>Avaliação do perfil de biomarcadores imunológicos no perfil clínico de pacientes com anemia falciforme / Alexander Leonardo Silva Junior. Manaus : [s.n.], 2021. 130 f. color.; 30 cm.</p> <p>Dissertação – PGSS – Ciências Aplicadas à Hematologia (Mestrado) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.</p> <p>Inclui bibliografia</p> <p>Orientador: Adriana Malheiro Alle Marie</p> <p>Coorientador: Erich Vinicius de Paula</p> <p>1. Moléculas. 2. Anemia Hemolítica. 3. Amazônia Brasileira. 4. Perfil Imune. 5. Inflamação. I. Adriana Malheiro Alle Marie (Orient.). II. Erich Vinicius de Paula (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Avaliação do perfil de biomarcadores imunológicos no perfil clínico de pacientes com anemia falciforme</p>
-------	--

Elaborado por Jeane Macelino Galves – CRB-11/463

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 012/2020

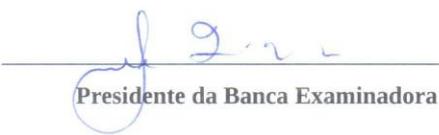
1
2
3 Ao décimo segundo dia do mês de novembro do ano de 2020, às 14h00, realizou-se no Auditório da
4 Fundação Hemoam, Bloco A, 2º andar da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do
5 Amazonas – HEMOAM, sito Av. Constantino Nery, 4397 – Chapada, a Defesa de Dissertação de
6 Mestrado do discente **Alexander Leonardo Silva Junior** sob o título “**Avaliação do Perfil de**
7 **Biomarcadores Imunológicos no Perfil Clínico de Pacientes com Anemia Falciforme**”, tendo
8 como orientadora a Profa. Dra. **Adriana Malheiro Alle Marie** e como coorientador o Prof. Dr.
9 **Erich Vinicius de Paula**, segundo encaminhamento do Prof. Dr. Nelson Abrahim Fraiji,
10 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia e de acordo
11 com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca
12 julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa,
13 tendo sido atribuído ao aluno o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto – Presidente	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) ()	Assinatura:  CPF: 03204317652
Profa. Dra. Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria – UFAM	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) ()	Assinatura:  CPF: 0686507636-21
Prof. Dr. Francisco Erivaldo Vidal Barros – UFAM	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) ()	Assinatura:  CPF: 830626293-04

15
16 O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

17
18 Aprovado Não Aprovado

19
20
21
22
23
24


Presidente da Banca Examinadora

Dedico este trabalho à minha mãe, Fabiane Amaral, a maior guerreira que já conheci, exemplo de pessoa e profissional, a quem me espelho todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me acompanhado todo este tempo, em períodos de força e fraqueza, e por ter guiado minha jornada até este momento.

Agradeço à minha mãe, Fabiane Amaral, e minha irmã, Larissa Amaral, por estarem do meu lado e me apoiarem durante todo este percurso. Não existem palavras suficientes para agradecer por todo o apoio e dedicação em me fazer quem sou como pessoa e como profissional. Obrigado mãe, pelo exemplo de profissional e ser humano que me proporcionaste, pelos momentos de sabedoria compartilhados e carinhos recebidos.

Agradeço em especial aos meus avós, Zuleika Amaral e Gaurino Gonçalves, que foram e são minhas referências desde pequeno. Palavras não são suficientes para expressar o agradecimento que sinto por todos os momentos de amor, dedicação e carinho.

Aos amigos que estiveram do meu lado todo esse tempo, Thaynara Ogaya, Felipe Picanço, Rosevelto Maia, Natasha Maranhão e Natália Oliveira. Obrigado por todo o carinho, pelas palavras de sabedoria, além das longas noites de conversa e compreensão dos meus momentos de drama e cansaço.

À minha orientadora, Dra. Adriana Malheiro, que foi mais do que uma orientadora. Agradeço imensamente por ter me orientado não só no mestrado, mas também na vida profissional, além de ser uma grande fonte de incentivo e ter acreditado no meu potencial pessoal e científico.

Ao meu coorientador, Dr. Erich Vinicius, pela confiança e dedicação que este projeto tivesse êxito. Ao Dr. Allyson Guimarães, pela paciência e por ser minha luz, em momentos de escuridão. Teste laboratorial nenhum é capaz de mensurar o quão importantes vocês foram ao meu mestrado, carreira acadêmica e profissional.

Ao Dr. Olindo Filho e Dra. Andrea Texeira, pelo apoio, confiança, dedicação e hospitalidade no Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz de Minas Gerais, onde tive ótimos momentos de crescimento pessoal e profissional. Aos colaboradores Dr. Matheus e Dr. Laurence, pela disposição, auxílio e apoio ao sucesso desta pesquisa. Ao Dr. Gemilson Pontes, pelo auxílio, paciência e contribuição por tornar este projeto possível!

Aos colaboradores que foram fundamentais para o sucesso deste projeto, Dra. Andrea Tarragô, Dr. Nelson e MSc. Evilázio Cardoso. Sou extremamente grato pelo apoio e dedicação de todos.

À Stephanny Dias, a aluna de iniciação científica que me acompanhou neste projeto. Obrigado pelos momentos de diversão, crescimento e aprendizado científico. Espero ter sido tão influente para você quanto foste na minha carreira.

Aos amigos e orientadores que a vida profissional me proporcionou, MSc. Marcelo Reis, Dra. Nadja Garcia e MSc. Hiochelson Najibe. Não encontro palavras para agradecer pelos momentos de conversa, apoio, ajuda e incentivo. Obrigado por estarem ao meu lado nesta caminhada.

Aos amigos que a pesquisa me deu, Melina Mello, Fabíola Silva, Lilyane Xabregas, Thaina Cristina, Grijalba Rodrigues, Graciela Chavez, Lilian Ferrari, Fábio Magalhães, Juliana Neves e Kerolaine Fonseca. Por todos os momentos de reflexão, estudo e diversão. Agradeço por fazerem parte desta etapa!

Aos integrantes da NAEP-HEMOAM, Gláucia Lima, Fabiane Bianca, Maria Gabriela, Juliana Santos e Regiane Costa, pelos momentos divertidos e reflexivos desde a época da faculdade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento do projeto maior e auxílio financeiro recebido ao longo do desenvolvimento deste projeto.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA) pela oportunidade de realizar mais esta etapa do meu crescimento profissional e por me acompanhar nesta jornada.

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) por fornecer a estrutura necessária ao desenvolvimento deste projeto. Agradeço aos diversos profissionais que tiveram envolvidos e contribuíram para a conclusão de mais uma etapa da minha vida profissional.

Agradeço imensamente aos pacientes com anemia falciforme, que aceitaram participar deste projeto e foram fundamentais na conclusão dos resultados incríveis. Espero poder contribuir na vida de cada um com estes resultados, como vocês contribuíram na conclusão deste projeto.

A todos aqui citados direta e indiretamente, meu muito obrigado!!

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) por financiar indiretamente esta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), responsável pelo pagamento da bolsa que colaborou para a realização deste estudo.

Ao Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD) pelo auxílio financeiro para o cumprimento dos procedimentos metodológicos.

“Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma”
Antoine Lavoisier

RESUMO

Introdução: A anemia falciforme é a doença monogênica de maior frequência no mundo. A mutação causa uma mudança na molécula de hemoglobina, que leva a um quadro de hemólise, acentuado em crises agudas de inflamação e caracterizado pela ativação do sistema imunológico. A participação de moléculas como quimiocinas, anafilotoxinas, citocinas e fatores de crescimento liberadas principalmente pelos leucócitos e células endoteliais aumenta o risco de desenvolver crises vaso-oclusivas e assim, as complicações clínicas observadas nesses pacientes. Devido à atuação das moléculas imunes na fisiopatologia falciforme, em diferentes quadros clínicos, ligado à escassez de estudos de biomarcadores, salienta-se a necessidade de caracterizar a concentração destas proteínas no estado inflamatório da anemia falciforme. **Objetivo:** Avaliar o perfil de moléculas imunológicas em pacientes com anemia falciforme em diferentes estados clínicos acompanhados na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). **Material e métodos:** Este é um estudo longitudinal que utilizou amostras biológicas de 53 doadores saudáveis, 27 pacientes com anemia falciforme em estado estacionário e 22 em crise aguda vaso-oclusiva, sendo estes últimos acompanhados com mais uma coleta, na fase de convalescença. As amostras foram provenientes de projetos já aprovados pelo CEP-HEMOAM. O hemograma foi realizado em analisador automatizado com amostras de sangue total, enquanto o soro foi utilizado na quantificação de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento pela técnica de Luminex, pelo kit *The BioPlex Pro-Human Cytokine 27-Plex* da *BioRad* na FIOCRUZ-MG e analisadas pelo software *BioPlex Manager*. As anafilotoxinas foram dosadas na Fundação HEMOAM pela técnica de Cytometric Bead Array, com o kit *The BD™ CBA Human Anaphylatoxin* e para aquisição foi utilizado o software FCAP Array. A análise estatística foi realizada no software *GraphPad Prism v. 5.0*, com intervalo de confiança de 95% e valor de $p < 0.05$ como estatisticamente significativo. A rede de correlação foi feita no software *Cytoscape v.3.1* e os heatmaps no software R 3.0.1. **Resultados:** Identificamos maior concentração de IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, PDGF-BB e G-CSF nos pacientes em crise vaso-oclusiva, que posteriormente demonstraram uma assinatura de biomarcadores para esta condição clínica. Outras moléculas apresentaram diferenças entre os perfis clínicos, mas não foram exclusivas apenas para o grupo de crise. A concentração de IL-10, IL-1ra e IL-1β foram identificadas por técnicas bioinformáticas com potencial para caracterizar os pacientes entre os estados clínicos. Na fase de convalescença, a CXCL8, CCL4, IL-1ra e PDGF-BB se mostraram potenciais marcadores de acompanhamento laboratorial após a crise. A análise da correlação mostrou maior relação das moléculas entre si no estado de crise, que tende a reduzir através da fase de convalescença, até o estado estacionário. **Conclusão:** O perfil de crise é marcado por citocinas anti-inflamatórias e de proliferação celular. IL-1ra e PDGF-BB são potenciais candidatos para marcadores de recuperação laboratorial, e concentração sérica de IL-10, IL-1ra e IL-1β podem ser utilizados para caracterizar o estado clínico do paciente falciforme. Mais estudos devem ser conduzidos para avaliar o potencial destas moléculas na progressão clínica, no prognóstico e no acompanhamento dos pacientes após a crise.

Palavras-chave: Moléculas, Anemia hemolítica, Amazônia brasileira, Perfil imune, Inflamação, Biomarcador.

ABSTRACT

Introduction: Sickle cell disease is the most common monogenic disorder around the world. The mutation leads to a shift on hemoglobin molecule, which takes to hemolysis condition, marked mainly during acute inflammatory crisis and characterized by immune system activation. The molecule participation as chemokines, anaphylatoxins, cytokines and growth factors released specially by leukocytes and endothelial cells increase the risk to develop vaso-occlusive crisis and so, the clinical complications observed in these patients. Due to immune molecule influence on sickle cell physiopathology, under different clinical status, related to scarcity of biomarkers studies, we highlight the need to characterize the concentration of these proteins on inflammatory state of sickle cell. **Objective:** Evaluate the immunological profile of patients with sickle cell anemia under different clinical status accompanied at Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). **Materials and methods:** This is a longitudinal study which used biological samples of 53 healthy blood donors, 27 patients with sickle cell anemia in steady-state condition, 22 patients in acute vaso-occlusive crisis, in which were accompanied with one more sample collection, at convalescence. The samples were from previous projects approved by CEP-HEMOAM. The blood count was performed with whole blood, while serum was used to quantification of cytokines, chemokines and growth factors by Luminex technic, with the kit BioPlex Pro-Human Cytokine 27-Plex from BioRad at FIOCRUZ-MG and analyzed by BioPlex Manager software. Anaphylatoxins were measured at Fundação HEMOAM by Cytometric Bead Array technic, with kit The BD CBA Human Anaphylatoxin, and FCAP Array software was used for acquisition. Statistical analysis was performed on GraphPad Prism v. 5.0 software, with confidence interval of 95% and $p < 0.05$ as statistically significant. Correlation network was performed on software Cytoscape v. 3.1. and heatmaps on software R 3.0.1. **Results:** We identified higher concentration of IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, PDGF-BB and G-CSF on vaso-occlusive patients, which further demonstrates a biomarker signature to this clinical condition. Other molecules showed different concentration under clinical profile, but were not exclusive only to crisis status. IL-10, IL-1ra and IL-1 β concentration were identified by bioinformatics technics as potential markers to cluster patients under clinical condition. In convalescence condition, CXCL8, CCL4, IL-1ra and PDGF-BB showed potentiality as laboratorial markers of follow-up after crisis. Correlation analysis showed higher relation of molecules in crisis condition, which reduced through convalescence until steady-state. **Conclusion:** Vaso-occlusive crisis profile is marked by anti-inflammatory and cell proliferation cytokines. IL-1ra and PDGF-BB are potential candidates as laboratorial markers to laboratorial recovery, and serum concentration of IL-10, IL-1ra and IL-1 β might be used to characterize the clinical status of sickle cell patient. More studies must be conducted to evaluate the potentiality of these molecules on clinical progression, on prognosis and follow-up of these patients after crisis.

Keywords: Molecules, Hemolytic anemia, Brazilian amazon, Immune profile, Inflammation, Biomarker.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alterações intracelulares da hemácia falciforme.	19
Figura 2: Quadro epidemiológico mundial dos nascidos vivos com anemia falciforme por 100.000 nascimentos no ano de 2015.	21
Figura 3: Prevalência da doença falciforme por região (à esquerda) e incidência nos principais estados (à direita) do Brasil.	22
Figura 4: Representação esquemática das alterações moleculares, celulares, inflamatórias e bioquímicas em pacientes com anemia falciforme.	24
Figura 5: Mecanismos de ativação e atuação do sistema complemento na anemia falciforme.	28
Figura 6: Procedimento de coleta das amostras biológicas, dosagem das proteínas solúveis e tratamento dos dados.	41
Figura 7: Concentrações circulantes das citocinas entre os grupos DS, EE e CVO.	45
Figura 8: Concentrações circulantes das quimiocinas entre os grupos DS, EE e CVO.	46
Figura 9: Concentrações circulantes dos fatores de crescimento entre os grupos DS, EE e CVO.	47
Figura 10: Concentrações circulantes das anafilotoxinas entre os grupos DS, EE e CVO. ...	48
Figura 11: Comparação das moléculas entre os grupos CVO e CV.	49
Figura 12: Correlação entre as moléculas e células imunológicas para os grupos DS, EE, CVO e CV.	51
Figura 13: Análise de alto produtores com base nos grupos controle (DS) e de pacientes falciformes EE e CVO, demonstrado pela assinatura de biomarcadores e Diagrama de Venn.	53
Figura 14: Análise bioinformática de moléculas séricas divididas em atributos do grupo controle e subgrupos de pacientes falciformes seguindo condições clínicas, representadas por heatmaps e árvores de decisão com base no z score.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição epidemiológica das variáveis de idade, gênero, cidade de residência e tratamento farmacológico crônico entre os grupos DS, EE, CVO e CV, com respectiva diferença significativa	42
Tabela 2: Dados laboratoriais dos grupos DS, EE, CVO e CV.....	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Nomenclaturas usual, e principal função biológica das citocinas.	29
Quadro 2: Nomenclaturas usual, nova, e principal função biológica das quimiocinas.	31
Quadro 3: Nomenclaturas usual e principal função biológica dos fatores de crescimento. ...	32

LISTA DE ABREVIATURAS

- HbAS: Traço falciforme;
- EUA: Estados Unidos da América;
- PNTN: Programa Nacional de Triagem Neonatal;
- HbS: Hemoglobina S;
- HbF: Hemoglobina Fetal;
- 2,3-DPG: 2,3-difosfoglicerato;
- HbSS: Ambos genes da hemoglobina mutados;
- β^0 : β -talassemia maior;
- β^+ : β -talassemia menor;
- O₂: Oxigênio;
- CVO: Crise vaso-oclusiva (do inglês *Vaso-Occlusive Crisis*);
- EE: Estado Estacionário;
- CV: Convalescença;
- TCR: Receptor de célula T;
- PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos;
- DAMPs: Padrões Moleculares Associados a Danos;
- HMGB1: *High Mobility Group Box 1*;
- NETs: Armadilha Extracelular de Neutrófilo (do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*);
- PRRs: Receptores de Reconhecimento Padrão (do inglês *Pattern Recognition Receptors*);
- TLR: Receptores do Tipo Toll (do inglês *Toll-Like Receptors*);
- RAGEs: Produto Final de Glicação Avançada (do inglês *Receptor for Advanced Glycation End Products*);
- MAC; Complexo de Ataque à Membrana;
- MBL: Lectina Ligadora de Manose (do inglês *Mannose-Binding Lectin*);
- Fc: Porção constante;
- NK: *Natural Killers*;
- G-CSF: Fator de Crescimento de Granulócito (do inglês *Granulocyte Colony Stimulating Factor*);
- GM-CSF: Fator de Crescimento de Granulócito-Macrófago (do inglês *Monocyte Granulocyte Colony Stimulating Factor*);
- APCs: Células Apresentadoras de Antígeno (do inglês *Antigen-Presenting Cells*);
- ALT: Alanina Aminotransferase;
- PIGF: Fator de Crescimento Placentário (do inglês *Placenta Growth Factor*);

PCR: Proteína C Reativa;

FT: Fator Tecidual;

PS: Fosfatidilserina (do inglês *Phosphatidylserine*);

HEMOAM: Hospital de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas;

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

TA: Termo de Assentimento;

SAME: Serviço de Atendimento Médico e Estatístico;

LAC: Laboratório de Análises Clínicas;

IL: Interleucina;

TNF: Fator de Necrose Tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*);

MCP: Proteína Quimioatrativa de Monócito (do inglês *Monocyte Chemoattractant Protein*);

MIP: Proteína Inflamatória de Macrófago (do inglês *Macrophage Inflammatory Protein*);

PDGF-BB: Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (do inglês *Platelet Derived Growth Factor*);

VEGF: Fator de Crescimento Vascular Endotelial (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*);

DS: Doadores Saudáveis;

CBA: *Cytometric Bead Array*.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1.	Etiologia e alterações moleculares da doença falciforme	18
1.2.	Aspectos históricos e epidemiológicos	20
1.3.	Fisiopatologia da anemia falciforme	22
1.3.1.	Ativação do sistema imunológico.....	24
1.3.2.	Ativação do sistema complemento e atuação na anemia falciforme.....	26
1.3.3.	Papel das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento na Anemia Falciforme	28
1.4.	Relevância	33
2.	OBJETIVOS	35
2.1.	Geral	35
2.2.	Específicos	35
3.	MATERIAL E MÉTODO	36
3.1.	Tipo de estudo	36
3.2.	Amostragem	36
3.3.	Aspectos éticos	36
3.4.	Local	36
3.5.	Critérios de elegibilidade	37
3.5.1.	Critérios de inclusão.....	37
3.5.2.	Critérios de não inclusão	37
3.5.3.	Critérios de exclusão.....	37
3.6.	Procedimentos	37
3.6.1.	Coleta de dados e material biológico	37
3.6.2.	Dosagem das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento.....	38
3.6.3.	Dosagem das anafilotoxinas	39
3.6.4.	Análise de dados	39
3.7.	Riscos e benefícios	41
4.	RESULTADOS	42
4.1.	Dados sócio-demográficos e laboratoriais	42

4.2.	Perfil das moléculas imunológicas entre o grupo controle e subgrupos de pacientes com anemia falciforme	44
4.3.	Perfil de moléculas após crise vaso-oclusiva	48
4.4.	Correlação das células e moléculas imunológicas com base nos subgrupos	49
4.5.	Análise de alto produtores em doadores saudáveis e subgrupos de pacientes com anemia falciforme	52
4.6.	Análise de correlação entre as moléculas com os perfis clínicos e árvores de decisão ...	53
5.	DISCUSSÃO	56
6.	CONCLUSÃO	62
7.	EQUIPE DO PROJETO	64
8.	FINANCIAMENTO E INFRAESTRUTURA	65
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
10.	ANEXOS	71
10.1.	Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM)	71
10.1.1.	Parecer do projeto “Potenciais Biomarcadores Celulares e Solúveis Associados a Diferentes Haplótipos e Fenótipos de Anemia Falciforme”	71
10.1.2.	Parecer do projeto “Marcadores de Ativação da Inflamação da Doença Falciforme” ...	75
10.2.	Termos de Consentimento (TCLE) e Assentimento (TA) aplicados	79
10.2.1.	TCLE do projeto “Potenciais Biomarcadores Celulares e Solúveis Associados a Diferentes Haplótipos e Fenótipos de Anemia Falciforme”	79
10.2.2.	TCLE do projeto “Marcadores de Ativação da Inflamação da Doença Falciforme”	81
10.2.3.	TA do projeto “Marcadores de Ativação da Inflamação da Doença Falciforme”	85
10.3.	Questionários aplicados aos pacientes com Anemia Falciforme	87
10.3.1.	Questionário do projeto “Potenciais Biomarcadores Celulares e Solúveis Associados a Diferentes Haplótipos e Fenótipos de Anemia Falciforme”	87
10.4.	Produção científica advinda dos resultados deste projeto	91
10.4.1.	Manuscrito submetido e aprovado na revista <i>Frontiers in Immunology</i>	91
10.4.2.	Artigo científico “Sickle Cell Anemia Patients Display an Intricate Cellular and Serum Biomarker Network Highlighted by TCD4+CD69+ Lymphocytes, IL-17/MIP-1 β , IL-12/VEGF, and IL-10/IP-10 Axis”	128
10.5.	Produção científica advinda dos resultados de outros projetos	129

1. INTRODUÇÃO

1.1. Etiologia e alterações moleculares da doença falciforme

A doença falciforme é uma das principais doenças genéticas autossômicas recessivas, causada pela transversão de uma adenina por uma timina no 17º nucleotídeo da região 15.5 do braço longo do cromossomo 11 no gene que codifica a cadeia β -globina (*HBB*). Esta mutação leva à troca na tradução de um ácido glutâmico por uma valina no 6º aminoácido da β -globina, levando à formação da hemoglobina S (HbS), uma molécula com peso molecular diferenciado da hemoglobina normal HbA1 ou HbA2, aspecto que é usado para o diagnóstico da doença falciforme (1–3).

A valina, advinda da mutação, tem o domínio hidrofóbico exposto e leva à formação de tetâmeros de HbS durante a desoxigenação nos capilares sanguíneos. Isso favorece a interação deste aminoácido com outros da cadeia de hemoglobina adjacente para esconder este domínio, cujos principais aminoácidos envolvidos são a fenilalanina (na posição 85) da cadeia β -globínica, leucina (na posição 88) e alanina, culminando na formação de polímeros de longas fibras (2–5).

A afinidade da molécula com o oxigênio contribui para a formação destes polímeros, compostos por aproximadamente 14 moléculas de HbS em cada sessão e que causa a mudança na morfologia eritrocitária para o formato de foice, em um processo descrito como falcização do eritrócito (3). Esta propensão à formação de polímeros em meios de baixa tensão de oxigênio é a base da fisiopatologia da anemia falciforme.

Fatores que influenciam na afinidade da hemoglobina com o oxigênio são pontos cruciais para a taxa de polimerização, podendo ser citados: concentração de HbS, níveis de oxigênio, temperatura, presença de outras hemoglobinas normais ou outras variantes e nível de hemoglobina fetal (HbF) (2,3,6). A concentração de HbS favorece a polimerização e consequente falcização, estando diretamente relacionada à quantidade de células falciformes na corrente sanguínea. O nível de oxigênio, segundo Naoum (2000), é o fator de maior relevância, uma vez que sua alta disponibilidade permite que a hemácia assumo o formato normal discoide e bicôncavo, entretanto, os níveis de moléculas como a 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e esfingosina quinase, que estão relacionadas com a afinidade da HbS com o oxigênio, também podem influenciar no processo de falcização (2,6). Foi descrito também que altas temperaturas favorecem a hiperventilação, e assim, aumento do ritmo cardíaco, o que leva à desoxigenação mais frequentemente e às apresentações clínicas. Além disso, outras variantes da hemoglobina também podem se apresentar em heterozigose com o gene falciforme e contribuir para o agravamento da clínica apresentada por estes pacientes (1). Por

fim, a produção da HbF, uma hemoglobina que não é afetada pela mutação, contribui para a redução da polimerização e consequente melhora do quadro clínico do paciente (1,3,6).

Estas alterações físico-químicas decorrentes da polimerização da HbS também levam a outras alterações celulares, como mudança da membrana lipídica do eritrócito, desidratação, falência energética celular, estresse oxidativo, maior grau de hemólise, rigidez, características reológicas, disfunção dos canais K-Cl, maior exposição de fosfatidilserina extracelular, desregulação da banda 3 (que culmina na formação de micropartículas), além da maior interação com outros componentes sanguíneos, como leucócitos, plaquetas e moléculas circulantes (Figura 1) (6,7).

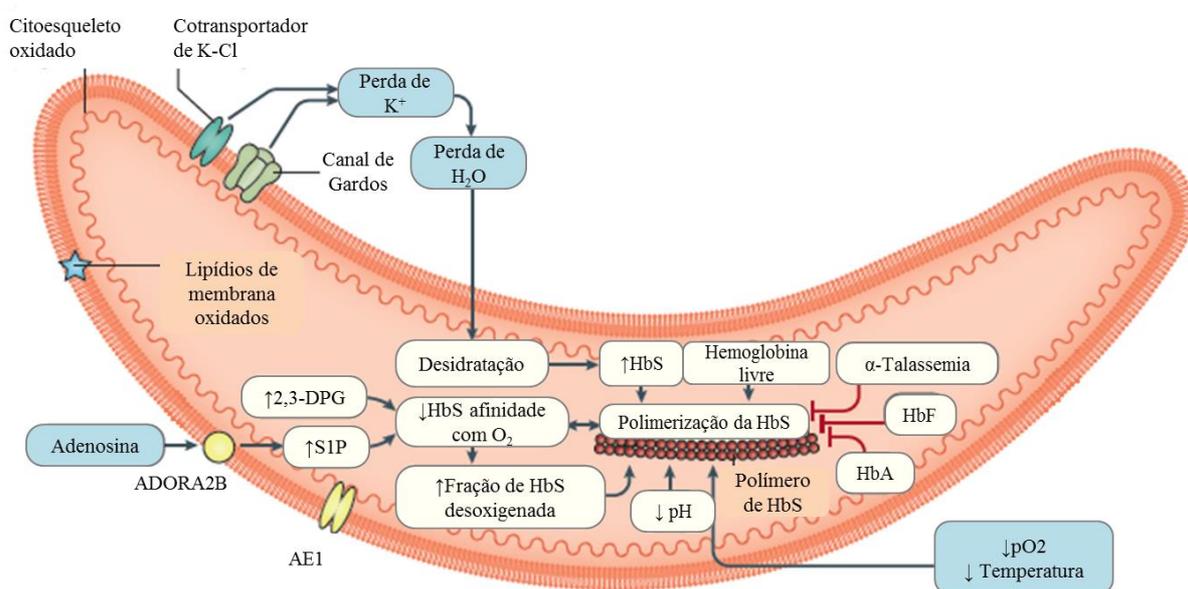


Figura 1: Alterações intracelulares da hemácia falciforme.

Fonte: Kato et. al., 2018; Adaptado por Silva-Junior.

A mutação que leva à formação da HbS pode estar em homozigose, ou associada a outras mutações responsáveis por hemoglobinopatias. A forma homozigótica (HbSS) é designada Anemia Falciforme (AF), enquanto que a co-herança em outras hemoglobinopatias é designada de Doença Falciforme. Os pacientes homozigotos tendem a desenvolver formas mais graves da doença, enquanto nos pacientes com doença falciforme (heterozigose composta como HbS/ β -talassemia, HbS/ α -talassemia, HbS/C, HbS/D e outras) apresentam em geral quadros clínicos menos graves (1,6).

Dentre os heterozigotos, os que apresentam quadros mais graves são aqueles em heterozigose com β -talassemia maior (β^0) e menor (β^+), HbS/O, HbS/D e HbS/C, enquanto os casos moderados são geralmente os com alguns genótipos de HbS/ β^+ , e HbS/C, e os mais

leves são HbS/β⁺⁺, HbS/E e HbS/A. A variação entre os grupos de risco também é dependente dos diferentes haplótipos apresentados, sendo estes, um dos fatores de risco associados ao agravamento dos pacientes (1).

Como já destacado, a herança isolada do alelo mutante em heterozigose (traço falciforme) não representa uma doença, não estando associada a nenhuma alteração significativa no hemograma, e causando apenas alterações menores na concentração de urina quando estes indivíduos são expostos e extremos de exaustão física (6,8). Este grupo de pessoas não faz parte do que chamamos de doença falciforme.

1.2. Aspectos históricos e epidemiológicos

A doença falciforme foi primeiramente descrita pelo médico James Herrick em 1910, ao atender um paciente natural de Grenada (9). Seu relato de caso com descrição do histórico clínico do paciente, assim como da morfologia apresentada pelos eritrócitos, levou a futuros estudos, e em 1947 foi sugerida a hereditariedade da doença (10). Além disso, em 1949 foi identificada a diferença no peso molecular da hemoglobina, norteados estudos para uma etiologia genética (11).

Em 1954 foi sugerida pela primeira vez que o quadro epidemiológico da doença ocorreu por conta da relação entre a anemia falciforme e o parasita causador da malária. Na África, a malária causada pelo *Plasmodium falciparum* é a mais prevalente, sendo que esta espécie já foi associada à maior suscetibilidade a casos graves da doença. Com isso, a taxa de mortalidade pelo *P. falciparum* é alta dentre aqueles que não possuem o gene da HbS, enquanto os heterozigotos apresentam a vantagem seletiva de não desenvolver a doença por dificultar o ciclo sanguíneo do parasita, e apresentar maior sobrevivência frente à malária, além de apresentarem também um quadro mais leve da doença falciforme (12,13).

Em contrapartida, os homozigotos, embora também não apresentem as características clínicas provenientes da malária, sua sobrevivência é reduzida pela condição clínica da própria anemia falciforme (6). Dessa forma, acredita-se que a condição de traço falciforme (HbAS) apresenta grande adaptabilidade à região contra o parasita, assim como contra os sinais clínicos da doença falciforme (6,12).

A alteração molecular em portadores da mutação, sejam homozigotos ou heterozigotos, contribuiu para o aumento da prevalência dessa doença na África. Assim, no período das grandes navegações, houve a disseminação de portadores do gene com a mutação, favorecendo assim, seu aparecimento em outras regiões do globo, como nas Américas e Ásia (6).

A AF é a doença monogênica de maior frequência no mundo, afetando principalmente países africanos, asiáticos e americanos, como Nigéria, Índia, Estados Unidos (EUA) e Brasil (Figura 2) (6,8,14). Aproximadamente 3,2 milhões de pessoas ao redor do mundo possuem o gene com a mutação para a doença, na sua forma homozigótica (anemia falciforme) ou heterozigótica com outra hemoglobinopatia (doença falciforme), enquanto 43 milhões carregam a mutação da hemoglobina S no gene *HBB* em apenas um dos alelos (traço falciforme). Estima-se que 176 mil pacientes vão a óbito por ano devido a algum fator advindo da doença (3).

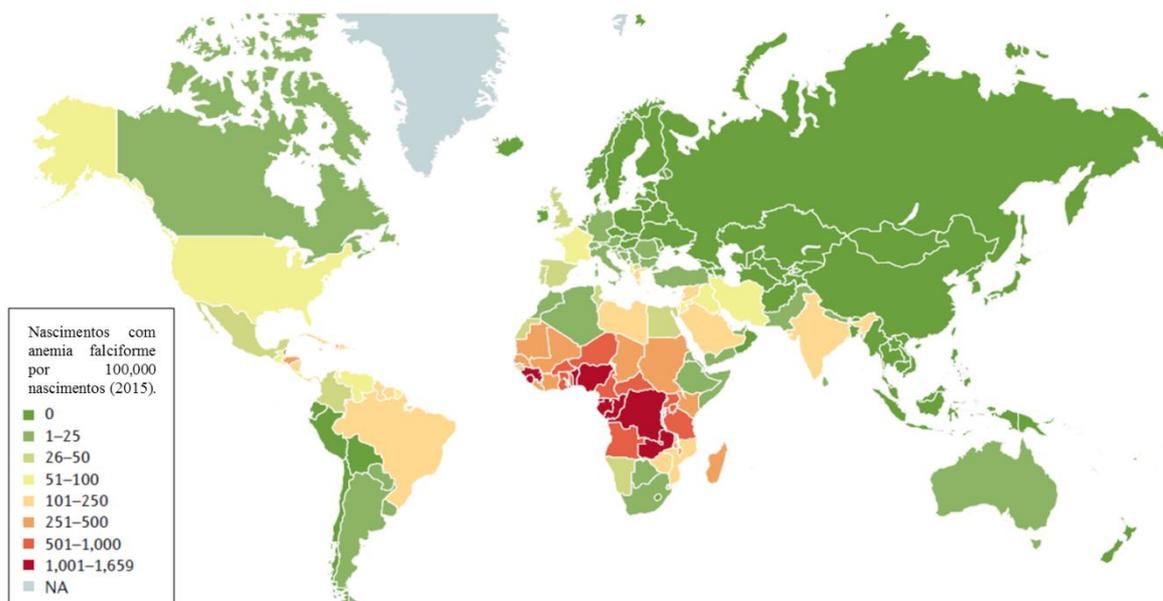


Figura 2: Quadro epidemiológico mundial dos nascidos vivos com anemia falciforme por 100.000 nascimentos no ano de 2015.

Fonte: Kato et. al., 2018; Adaptado por Silva-Junior.

No Brasil, assim como em países desenvolvidos como os Estados Unidos da América, o diagnóstico é feito através da eletroforese de hemoglobina e identificação genética da mutação nos primeiros dias de vida do neonato, através do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), possibilitando a identificação precoce desta condição (15).

O PNTN favorece o rastreamento dos pacientes, à segregação dos homozigotos e heterozigotos, o acompanhamento precoce e o tratamento eficaz, permitindo maior expectativa de vida aos portadores da mutação (6). O Brasil é o país da América do Sul com maior número de casos, com estimativa do nascimento de 3.000 crianças homozigotas e 180.000 com o traço falciforme por ano (16,17).

Sabe-se que a prevalência da doença é heterogênea na população brasileira, com maior número nas regiões Norte e Nordeste (6-10% na população), embora a incidência seja

variável entre os estados. A Bahia apresenta o principal quantitativo de descendentes africanos e é o estado brasileiro com maior incidência de casos falciformes (Figura 3), com proporções de 1 caso homozigoto para cada 650 nascidos vivos e 1 traço falciforme a cada 17 nascidos vivos, seguido pelo Rio de Janeiro e outros estados do Nordeste (18).

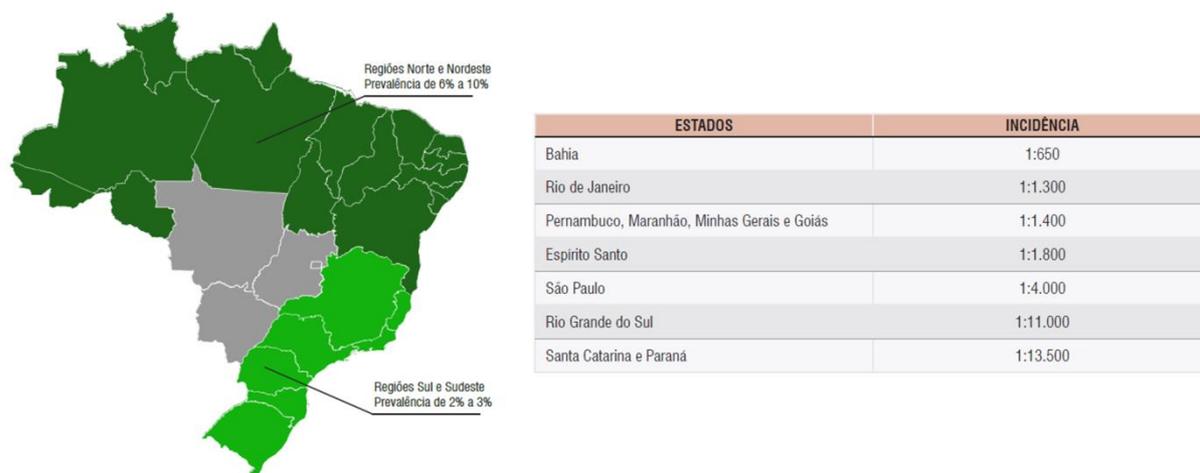


Figura 3: Prevalência da doença falciforme por região (à esquerda) e incidência nos principais estados (à direita) do Brasil.

Fonte: Brasil, 2015; Adaptado por Silva-Junior.

Dados sobre o perfil epidemiológico da doença falciforme na Região Norte, e mais especificamente no estado do Amazonas, foram recentemente publicados por um grupo de pesquisa de nossa instituição (19). O interesse por uma caracterização mais detalhada destes pacientes decorre do impacto potencial de fatores ligados à miscigenação populacional no estado e aos altos níveis de doenças infecciosas na região amazônica, que poderiam modificar a apresentação clínica da doença falciforme nestes pacientes. Neste contexto, estudos que exploram aspectos da resposta imune nesta população são importantes para ampliar nosso conhecimento sobre as bases moleculares e celulares da grande heterogeneidade clínica desta doença em diferentes populações.

1.3. Fisiopatologia da anemia falciforme

Ao passarem pelos capilares sanguíneos, as hemácias de pacientes com doença falciforme, quando submetidas ao processo de desoxigenação, onde há a transferência de Oxigênio (O_2) para o tecido, sofrem o processo de polimerização da HbS, que é o marco inicial e primordial

para o quadro fisiopatológico e complicações secundárias apresentadas por estes pacientes (2,5).

Com a polimerização, há comprometimento direto e indireto da membrana eritrocitária através dos altos níveis de desidratação e expressão de fosfatidilserina na camada externa da membrana celular. Esses fatores contribuem para o processo de hemólise intra e extravascular, além de alterarem o perfil fisiopatológico, como ativação endotelial, vias de coagulação e formação de interações celulares entre as hemácias, leucócitos e plaquetas (6). A exposição destas moléculas leva ao maior grau de adesão hemácia-endotélio e hemácia-leucócito, causando um quadro de isquemia, que por fim culmina em isquemia e reperfusão em um processo de retroalimentação do processo patológico (3).

A interação do perfil fisiopatológico, ligados a fatores epidemiológicos, bioquímicos, genéticos e fisiológicos, e ao dano membranar causados no processo de polimerização, contribui para a redução da meia-vida destas células, potencializando o processo de hemólise e caracterizando a anemia falciforme como uma das principais anemias hemolíticas (6). Os altos níveis de hemólise levam à liberação de hemoglobina, além de apresentarem efeitos locais e sistêmicos, acabam por ser reconhecida pelas células endoteliais e circulantes do sistema imune, culminando na ativação de vias de sinalização intracelulares das células endoteliais e leucócitos para produção de moléculas inflamatórias e expressão de moléculas de adesão, ligadas principalmente às células do endotélio (6,20).

Já foi observada uma relação positiva entre o nível de hemólise e o estado inflamatório nesses pacientes, o que leva à leucocitose, principalmente devido ao aumento de monócitos, linfócitos e neutrófilos (7,20). Além disso, a liberação de moléculas imunológicas favorece a comunicação das células falciformes ao endotélio e outras células circulantes, causando a principal complicação observada nesses pacientes: as crises vaso-oclusivas (CVO) (Figura 4) (3).

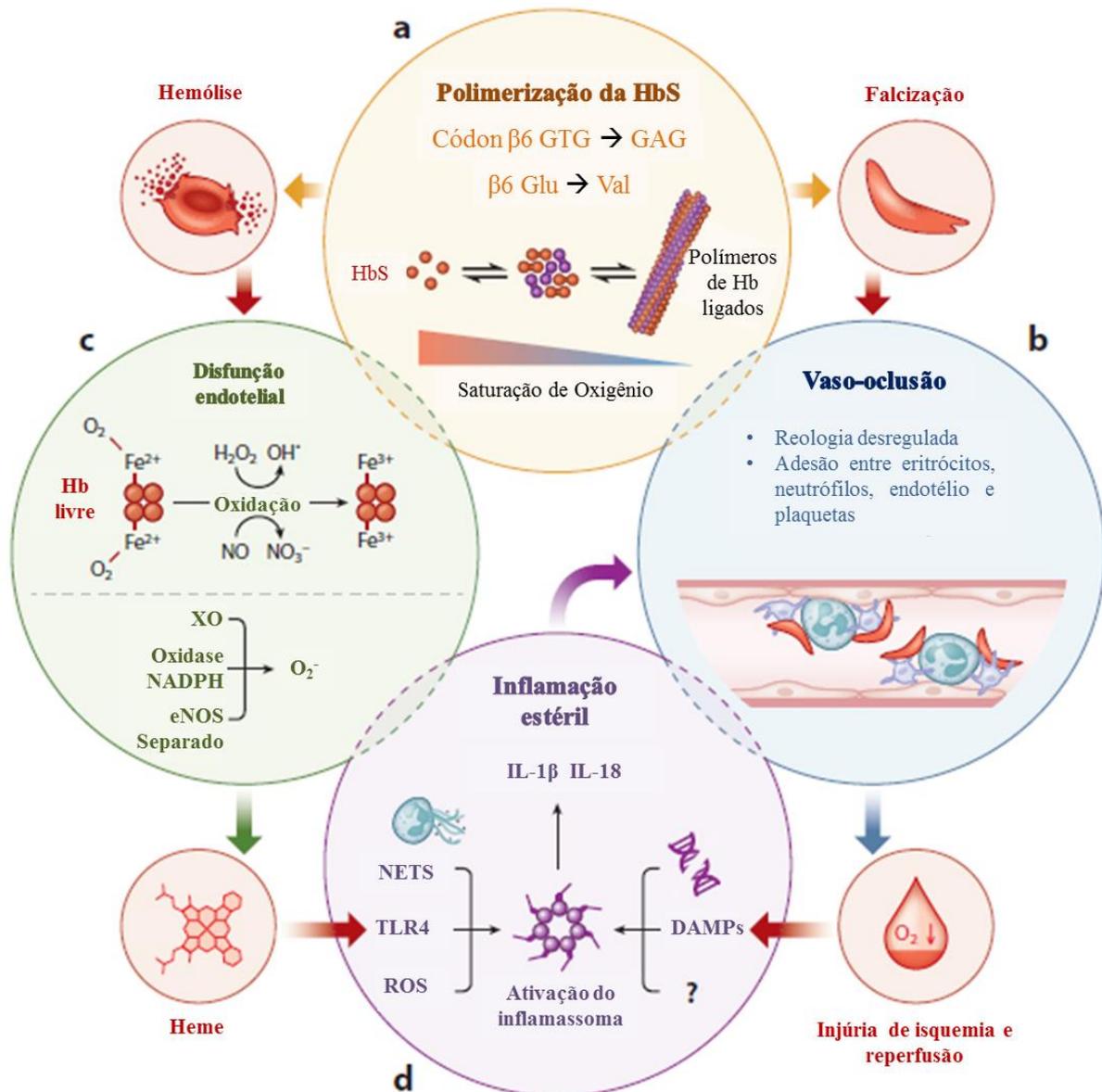


Figura 4: Representação esquemática das alterações moleculares, celulares, inflamatórias e bioquímicas em pacientes com anemia falciforme.

Fonte: Sundd, Gladwin & Novelli, 2018. Adaptado por Silva-Junior.

1.3.1. Ativação do sistema imunológico

O sistema imunológico é composto por células e moléculas responsáveis por eliminar patógenos através do reconhecimento de antígenos (moléculas reconhecidas como estranhas ao organismo). Esses antígenos geralmente estão presentes em componentes microbianos e são classificados como Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), entretanto, produtos de degradação e lise celular do processo patológico podem ser reconhecidos como Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) e assim como os PAMPs, estimularem a ativação do sistema imunológico e o processo inflamatório (21).

Por se tratar de uma doença inflamatória crônica estéril, o reconhecimento de PAMPs não é o elemento central no quadro inflamatório da anemia falciforme, exceto durante algumas crises vaso-oclusivas, que podem ser desencadeadas por quadros infecciosos. Fora deste contexto, a ativação da imunidade inata na anemia falciforme é mediada mais frequentemente pela liberação de DAMPs (3,21), sendo a hemólise um dos elementos mais importantes na liberação destes mediadores. A hemólise intravascular leva à liberação de mediadores inflamatórios como a hemoglobina livre, o heme, além de outros como *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) e componentes de neutrófilos liberados durante a formação de *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) (22–26).

A liberação da hemoglobina extracelular leva ao consumo de óxido nítrico, com consequente redução do efeito anti-inflamatório e antiadesivo deste mediador. Além disso, esta hemoglobina livre extracelular pode ser oxidada o que leva à liberação do grupo heme. O heme livre parece ser capaz de catalisar a oxidação de proteínas, produzir peróxidos lipídicos e aumentar os níveis de estresse oxidativo (culminando em danos ao DNA) (27). Tanto a hemoglobina livre, quanto a heme, podem ser reconhecidas como DAMPs pelas células do endotélio e do sistema imunológico através dos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs), cujos principais envolvidos são os receptores do tipo Toll 2 e 4 (TLR-2 e TLR-4, respectivamente) (6,24,25,28,29). Essas moléculas são expressas majoritariamente em monócitos/macrófagos, neutrófilos e células endoteliais, embora haja o envolvimento de outros receptores, como os Receptores de Produto Final de Glicação Avançada (RAGEs) (24,25,30).

Com o reconhecimento de DAMPs, há estímulo do processo inflamatório, mediado por leucócitos, principalmente monócitos, neutrófilos e linfócitos, os quais já foram relacionados ao maior risco às complicações clínicas e à morte devido à ocorrência de crises vaso-oclusivas (6,31).

A ativação das células endoteliais e do sistema imune leva à maior expressão de Fator Tecidual (FT) (32), culminando na produção de moléculas imunes e com altos níveis plasmáticos de mecanismos inflamatórios, como proteína C reativa (PCR), endotelina-1, contagem de leucócitos e contagem de monócitos (31,32). Além disso, a alta expressão de fosfatidilserina (PS) pelos reticulócitos, microvesículas e hemácias com HbS também contribuem para o estímulo da hemostasia através da interação com macrófagos e complexos proteicos, como serinoproteases (32).

Embora muitos estudos avaliem a participação de fatores imunológicos e não imunológicos no processo de CVO, o envolvimento das moléculas do sistema imune na vaso-

oclusão ainda é um ponto chave para elucidar o perfil inflamatório e análise de potenciais biomarcadores característicos dos estados clínicos observados nos pacientes com anemia falciforme.

1.3.2. Ativação do sistema complemento e atuação na anemia falciforme

O sistema complemento engloba um conjunto de glicoproteínas séricas que são produzidas pelo fígado, macrófagos e fibroblastos, caracterizadas como zimogênios devido à sua capacidade de serem ativadas em formato de cascata. Possui a função de complementar a ação celular do sistema imunológico, tanto da imunidade inata quanto da adaptativa, através do reconhecimento direto ou indireto de componentes microbianos, que leva à clivagem proteolítica dos seus elementos em cascata até a produção do Complexo de Ataque à Membrana (MAC) e liberação de fragmentos plasmáticos, que contribui para a inflamação (21,26).

A ativação do sistema complemento ocorre por 3 mecanismos: clivagem espontânea de C3 em um processo denominado amplificação de C3, na via alternativa; reconhecimento da porção Fc de anticorpos ativados através da ligação antígeno-anticorpo, na via clássica; ou reconhecimento de manose pela lectina ligadora de manose (MBL) ligada à MASP1 e MASP2 na via das lectinas. O estímulo à inflamação através do sistema complemento depende do gatilho inicial, que induz a lise celular e estimula a inflamação, embora geralmente mais de uma via está ativada no estado inflamatório (26,33).

A clivagem espontânea de C3 em C3a e C3b na via alternativa ocorre de forma natural, mas em níveis basais, sendo potencializada na presença de estímulos advindos de componentes microbianos. A molécula C3b é capaz de capturar uma molécula de Fator B, que então se torna suscetível à clivagem pelo Fator D, produzindo assim os fragmentos Ba e Bb. Este último se liga à C3b, formando o complexo C3bBb e que tem função de C3-convertase (catalisa a clivagem de C3 em C3a e C3b). Este complexo é capaz de se ligar na membrana celular e continuar seu processo de ativação, no entanto, as células de mamíferos produzem moléculas capazes de degradar este complexo, como o CD46 e CD59, o que garante o bloqueio da cascata do complemento, caso se inicie em uma célula do próprio organismo. Microrganismos não possuem tais moléculas na sua membrana, o que permite que o sistema complemento atue tanto na lise celular, quanto na indução do estado inflamatório (21,33).

A ligação da C3-convertase na membrana do microrganismo é estabilizada pela properdina, um fator regulador do complemento, que também é capaz de ser inibido quando

em células de mamíferos. A C3-convertase potencializa a clivagem de C3, posteriormente um dos fragmentos de C3b é capaz de se ligar à C3-convertase e dar origem ao complexo C3bBbC3b, uma C5-convertase, que culminará na via comum do sistema complemento (21,33–35).

A via clássica é ativada pelo reconhecimento da porção constante (Fc) de anticorpos que realizaram a ligação antígeno-específica. Após o reconhecimento do antígeno, a porção Fc é exposta, e assim se torna permissível ao reconhecimento pela C1q, uma molécula hexamérica, composta por C1r e subunidades de C1s. A ativação da via clássica se dá pela interação da C1q com pelo menos dois anticorpos da classe IgG, cujas porções Fc estejam próximas, ou a um único anticorpo IgM, onde este pode ativar até duas moléculas de C1q (21).

Com o reconhecimento das porções Fc de IgG ou IgM, a C1q ativa a ação enzimática da C1r, que cliva C1s. A C1s ativada pela C1r cliva C4 em C4a e C4b, e C2 em C2a e C2b. A C4b, agora solúvel, se liga à membrana e em conjunto com o fragmento de C2a, compõe uma C3-convertase. Após a formação do complexo C4b2a, o fragmento da C4b é capaz de capturar uma molécula de C3 presente no plasma, enquanto a C2a causa a proteólise desta molécula, gerando C3a e C3b. Com a interação do complexo com um fragmento de C3b, há formação de uma C5-convertase (C4b2a3b) e outras C3-convertases (pela via alternativa), que culmina na ativação da via comum do complemento (21,36).

A via comum do complemento se inicia com a formação da C5-convertase através de qualquer uma das três vias. Para os pacientes falciformes, por haver uma inflamação estéril (sem microrganismos), o quadro inflamatório é baseado na ativação principal das vias alternativa e clássica, embora a via das lectinas também possa ser ativada na presença de agentes microbianos nesses pacientes (21,36).

O complexo C5-convertase reconhece a C5 livre e a cliva nos fragmentos de C5a e C5b. Esta última se liga à membrana celular e induz à ligação da C6, C7, C8 e C9, formando o MAC, responsável por permitir a passagem livre de água e íons na membrana da célula, de forma que atuem na desregulação osmótica, causando a lise celular (21,26,33,36).

Os fragmentos das moléculas liberadas no processo de clivagem (C3a, C4a e C5a) são denominados de anafilotoxinas e circulam na corrente sanguínea até serem reconhecidos pelas células circulantes e endoteliais de forma a estimular a inflamação. A titulação destas anafilotoxinas está diretamente relacionada com a clivagem das moléculas de C3, C4 e C5, e consequentemente, ativação das diferentes vias do sistema complemento (26,33).

Na anemia falciforme, há principalmente ativação das vias alternativa e clássica, a depender do estímulo. A via clássica pode ser ativada através do reconhecimento de aloanticorpos devido à politransusão, procedimento que é comum nesses pacientes. Entretanto, estudos demonstram que a principal via do complemento que participa no quadro inflamatório estéril é a via alternativa, uma vez que o aumento dos níveis de heme livre (em decorrência da hemólise) é capaz de estimular a clivagem espontânea de C3 em C3a e C3b (Figura 5). Além disso, a heme também é capaz de reduzir a expressão das proteínas reguladoras do complemento CD46 e CD59 nas células do próprio organismo, culminando no agravamento da injúria vascular e maior estado inflamatório mediado pelas anafilotoxinas (34,37–40).

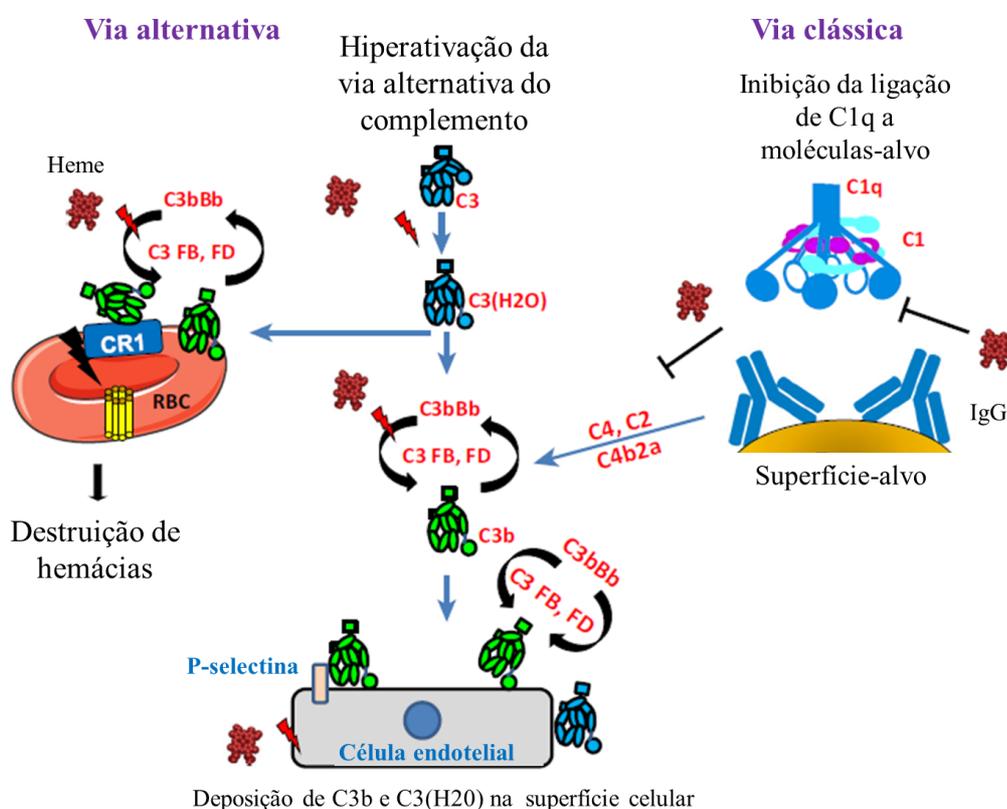


Figura 5: Mecanismos de ativação e atuação do sistema complemento na anemia falciforme. Fonte: Roumenina, 2016. Adaptado por Silva-Junior.

1.3.3. Papel das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento na Anemia Falciforme

As citocinas e quimiocinas são um conjunto de moléculas pertencentes ao sistema imune, responsáveis por mediar a interação das células circulantes com o endotélio, com o estroma medular e com outros tecidos. As citocinas são moléculas capazes de serem reconhecidas por

receptores membranares específicos e induzir à inflamação (ex. IL-1 β , IL-6, IL-8) ou inibi-la (ex. IL-10, TGF- β). Sua funcionalidade frente aos diferentes estados inflamatórios, seja estéril ou não, é bastante descrita na literatura, embora haja novos estudos de perfis celulares que descrevem novas características funcionais destas moléculas (41–43). O quadro 1 descreve a funcionalidade de algumas citocinas importantes para o perfil imunológico no organismo humano.

Quadro 1: Nomenclaturas usual, e principal função biológica das citocinas.

	Nomenclatura usual	Função biológica	Ref.
Citocinas	IL-1 β	Ativação de células endoteliais e linfócitos T, estímulo à inflamação, febre, adesão celular e síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado.	(7,21,44)
	IL-1ra	Antagonista da IL-1 em respostas de perfil Th2, com efeito deletério da IL-1 na inflamação.	(21,44)
	IL-2	Proliferação e ativação de linfócitos (T, B e NK), diferenciação e sobrevivência de linfócitos T.	(7,21,43)
	IL-4	Ativação de macrófagos, proliferação de linfócitos B e T, diferenciação de linfócitos T para perfil Th2, produção de IgE e IgG e expressão de MHC II.	(7,21,41,44)
	IL-5	Produção, ativação, quimioatração e sobrevivência de eosinófilos, e produção de IgA e IgM.	(21,41,44)
	IL-6	Proliferação de linfócitos B, produção de anticorpos IgG, estímulo da inflamação aguda e crônica, síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado.	(7,21,41,43)
	IL-7	Proliferação de progenitores linfocíticos e sobrevivência de linfócitos T e B, virgens e de memória, proliferação e diferenciação de TCD8 ⁺ e NK, e estimula atividade tumoricida de monócitos e macrófagos.	(21,43,44)
	IL-9	Sobrevivência e ativação de linfócitos, mastócitos e células teciduais.	(21,41)
	IL-10	Ação anti-inflamatória, inibição	(7,21,43,44)

		de IL-12, coestimuladores e MHC de classe II.	
	IL-12p70	Indução de IFN- γ e citotoxicidade por NK e linfócitos T, diferenciação de linfócitos T virgens em perfil Th1.	(41,42)
	IL-13	Ativação alternativa de macrófagos, produção de IgE pelos linfócitos B e de colágeno pelos fibroblastos.	(21,43)
	IL-15	Proliferação de células NK e linfócitos T, quimioatração de linfócitos T, sobrevivência das células TCD8+ de memória.	(21,44)
	IL-17A	Aumento da produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos e de G-CSF e GM-CSF pelas células epiteliais, além do recrutamento de neutrófilos e ativação de fibroblastos.	(21,44)
	IFN- γ	Diferenciação das células T em Th1, ativação clássica dos macrófagos, ativação de neutrófilos, aumento da expressão de MHC I e II e inibição do perfil Th2.	(21,41,44)
	TNF- α	Ativação das células endoteliais e neutrófilos, estimula a adesão celular, degranulação, inflamação, fagocitose e febre.	(21,41,44)

Já as quimiocinas são um tipo específico de citocina, cuja função primordial está relacionada à quimiotaxia de células sanguíneas para os tecidos, de forma a induzir a migração para sítios teciduais específicos e assim contribuir na eliminação de patógenos e outros componentes microbianos (26,43). São classificadas em quatro famílias com base na disposição dos resíduos de cisteína N-terminal, o que está diretamente relacionada à capacidade quimiotática frente à diapedese dos leucócitos. As quatro famílias são: CC, onde os resíduos são adjacentes, e atuam principalmente nos monócitos, basófilos, eosinófilos e células Natural Killers (NK); CXC, caracterizada pela presença de um aminoácido entre os resíduos, e interação majoritariamente com neutrófilos; C, onde há apenas uma cisteína; ou CX3C, com 3 aminoácidos entre os resíduos. Esta classificação está diretamente relacionada com a capacidade quimiotática frente à diapedese dos leucócitos (21,26,45), e a função de algumas quimiocinas está descrita no quadro 2.

Quadro 2: Nomenclaturas usual, nova, e principal função biológica das quimiocinas.

	Nomenclatura usual	Nova nomenclatura	Função biológica	Ref.
Quimiocinas	IL-8	CXCL8	Angiogênese, neovascularização e migração de neutrófilos, monócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos.	(7,26,41,43,46)
	IP-10	CXCL10	Ativação e recrutamento de linfócitos Th1, eosinófilos, monócitos e NK.	(47,48)
	MCP-1	CCL2	Atividade pró-inflamatória, recrutamento de monócitos, linfócitos T, NK, e células dendríticas.	(26,41,49)
	MIP-1 α	CCL3	Recrutamento de monócitos, linfócitos T e NK e eosinófilos, e manejo da inflamação aguda e crônica.	(41,50)
	MIP-1 β	CCL4	Recrutamento de células do sistema imune, manejo da inflamação aguda e crônica.	(50,51)
	RANTES	CCL5	Recrutamento de monócitos, linfócitos T e eosinófilos.	(41)
	Eotaxina	CCL11	Migração quimiotática de neutrófilos.	(41)

Os fatores de crescimento por sua vez são proteínas que modulam o crescimento celular, e sua função e liberação estão relacionados ao estágio de maturação das células. Os principais exemplos são os fatores de crescimento de granulócitos (G-CSF [do inglês *Granulocyte Colony Stimulating Factor*]) e de granulócito-macrófago (GM-CSF [do inglês *Monocyte Granulocyte Colony Stimulating Factor*]). O primeiro é responsável por induzir a proliferação das células tronco hematopoiéticas presentes na medula óssea, em conjunto com outras citocinas, e levar à sua diferenciação na linhagem granulocítica para induzir a maturação e produção de células, principalmente neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos, enquanto o segundo é específico para diferenciação de monócitos/macrófagos, uma vez que este tipo celular possui grande influência no estado inflamatório e é uma das principais células apresentadoras de antígeno (APCs) (21,41). Outros fatores de crescimento envolvidos nos processos biológicos estão descritos no quadro 3.

Quadro 3: Nomenclaturas usual e principal função biológica dos fatores de crescimento.

	Nomenclatura usual	Função biológica	Ref.
Fatores de Crescimento	G-CSF	Maturação de granulócitos.	(21,41)
	GM-CSF	Proliferação e maturação de granulócitos, monócitos/macrófagos e células dendríticas, e ativação de macrófagos.	(21,41,44)
	FGF Básico	Proliferação das células endoteliais, cicatrização e angiogênese.	(52,53)
	PDGF-BB	Hematopoiese extramedular, maturação vascular, proliferação angiogênese, recrutamento de fibroblastos e síntese da matriz extracelular.	(54–56)
	VEGF	Angiogênese, aumento da permeabilidade vascular e atividade pró-inflamatória.	(57,58)

Devido à participação e influência do sistema imunológico frente ao quadro inflamatório apresentado pelos pacientes com doença falciforme, é razoável supor que a resposta inflamatória seja distinta nos dois estados clínicos descritos nestes pacientes. Para fins didáticos e de padronização de pesquisa, os pacientes com doença falciforme são em geral classificados como em estado estacionário e em crise vaso-oclusiva. No primeiro, o processo fisiopatológico anteriormente descrito encontra-se ativo (hemólise, vaso-oclusão, ativação da imunidade inata e alterações de adesão celular), mas o paciente não apresenta agudização do estado clínico, mas sim sem sintomas de forma geral. Já a crise vaso-oclusiva (CVO) é caracterizada por diferentes sinais e sintomas, sendo a mais frequente em ossos longos e insuficiência respiratória. As CVOs ocorrem quando os mecanismos fisiopatológicos da doença levam a isquemia tecidual aguda, podem levar o paciente a complicações graves e até a óbito (3,30,59,60).

Já foram realizados estudos para caracterizar o perfil de muitas moléculas imunes em ambas condições clínicas, de forma a identificar possíveis biomarcadores inflamatórios e alvos terapêuticos. Foi observado que o padrão laboratorial dos pacientes em estado estacionário é caracterizado por níveis baixos de HbS, proteína C reativa, bilirrubina direta, proteínas totais, albumina e alanina aminotransferase (ALT), o que pode influenciar o perfil de moléculas séricas, dentre elas, as citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (61–63).

A interação das moléculas no contexto vaso-oclusivo ainda é um tópico a ser esclarecido, já que contribuem para a estimulação do perfil inflamatório, recrutamento e proliferação celular observado nas diferentes condições clínicas desses pacientes (3,6,35,64).

1.4. Relevância

A anemia falciforme é a doença monogênica de maior prevalência no mundo. Devido ao contexto histórico mundial e brasileiro, a colonização favoreceu a dispersão do gene mutado pelo Brasil, que é um dos países com maior número de casos de pacientes falciformes, com maior concentração nas regiões Norte e Nordeste.

A mutação leva a mudanças estruturais na hemoglobina, o que está diretamente relacionado ao alto grau de hemólise e desenvolvimento de crises vaso-oclusivas observadas nesses pacientes. Com esses fatores, há estímulo da resposta imunológica em um processo estéril, de forma a caracterizar a anemia falciforme como uma doença inflamatória crônica, cujos principais mediadores desse processo são os componentes do sistema imune, dentre eles, as células e moléculas, responsáveis por orquestrar o perfil inflamatório.

Já foi demonstrada a diferença nas concentrações dessas moléculas e sua influência no estado inflamatório do paciente, principalmente citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e anafilotoxinas em pacientes com anemia falciforme nos momentos de crise vaso-oclusiva em comparação com o estado estacionário. No entanto, a transição do estado de crise para estacionário dura meses, enquanto do estacionário para a crise, apenas dias, demonstrando a necessidade de identificar biomarcadores imunológicos para caracterizar ambos os perfis e sugerir novos marcadores de progressão clínica.

Estudos realizados por grupos de pesquisa vêm descrevendo possíveis biomarcadores associados às crises vaso-oclusivas, de forma a prevenir um quadro vaso-oclusivo e garantir melhor estabilidade fisiológica ao paciente, além da qualidade de vida. No entanto, poucos estudos avaliam o perfil de moléculas de paciente em crise, em estado estacionário e no período de convalescença, o que salienta a necessidade de compreender melhor a interação das moléculas imunológicas no contexto inflamatório, sua participação no período após a crise e no estado estacionário.

Assim, este estudo propõe descrever o perfil de moléculas imunológicas nos momentos de crise vaso-oclusiva, fase de convalescença (quando estes pacientes estão clinicamente saudáveis após uma crise recente) e em estado estacionário (mínimo de 90 dias sem crise), para identificar as moléculas envolvidas em cada grupo, além de correlacionar as concentrações destas moléculas com a gravidade da doença, avaliar sua importância no curso

clínico e identificar possíveis biomarcadores de predisposição clínica às crises vaso-oclusivas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o perfil de moléculas imunológicas em pacientes com anemia falciforme em diferentes estados clínicos acompanhados na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

2.2. Específicos

- Quantificar citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e anafilotoxinas em doadores saudáveis e em pacientes com anemia falciforme em crise vaso-oclusiva, fase de convalescença e em estado estacionário;
- Descrever e caracterizar a concentração das moléculas nos diferentes estados clínicos dos pacientes com anemia falciforme;
- Identificar possíveis biomarcadores solúveis associados à condição clínica dos pacientes com anemia falciforme.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Tipo de estudo

Este é um estudo longitudinal, composto por 4 grupos: 1) Indivíduos aptos à doação de sangue, como grupo controle (DS); 2) Pacientes portadores de anemia falciforme em estado estacionário (EE); 3) Pacientes portadores de anemia falciforme em crise vaso-oclusiva aguda (CVO), que deram entrada na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM); 4) Pacientes do grupo de CVO, avaliados de forma longitudinal, cuja segunda coleta ocorreu, entre 30 e 90 dias após a alta hospitalar, descritos como grupo de convalescença (CV).

3.2. Amostragem

O grupo DS foi composto por 53 doadores de sangue saudáveis, que aceitaram participar do estudo como grupo controle saudável. O grupo EE foi composto por 27 pacientes com anemia falciforme em estado estacionário, enquanto o grupo de pacientes em crise vaso-oclusiva (CVO) foi composto por 22 pacientes, avaliados de forma longitudinal, cuja primeira coleta foi no momento da admissão à Fundação HEMOAM com crise algica, e a segunda coleta ocorreu na fase de convalescença, no período de 30 a 90 dias após a alta hospitalar dos pacientes incluídos no grupo CVO.

3.3. Aspectos éticos

As amostras utilizadas nesse projeto foram provenientes de outros dois estudos realizados anteriormente e intitulados: “*Potenciais Biomarcadores Celulares e Solúveis Associados a Diferentes Haplótipos e Fenótipos de Anemia Falciforme*” com nº de parecer: 1.864.640; e “*Marcadores de Ativação da Inflamação da Doença Falciforme*” com nº de parecer: 2.478.469 (Anexos 5.1.1 e 5.1.2). Ambos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOAM (CEP-HEMOAM), com anuência da instituição. Cada paciente que aceitou participar do estudo, independente do projeto, o fez através da assinatura do respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de cada projeto ou Termo de Assentimento (TA), para crianças maiores de 10 anos que apresentaram crise vaso-oclusiva.

3.4. Local

Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

3.5. Critérios de elegibilidade

3.5.1. Critérios de inclusão

O grupo de doadores saudáveis foi composto por candidatos à doação de sangue, que assinaram o TCLE, foram considerados elegíveis à doação, e não apresentaram nenhuma doença genética ou infecciosa no momento da doação.

Os critérios gerais de inclusão que se aplicaram aos grupos de pacientes falciformes (SS, CVO e CV) foram: Pacientes diagnosticados com anemia falciforme, homocigotos para o alelo S (HbSS), que aceitaram participar do estudo através da assinatura do TCLE ou TA e sem nenhuma outra doença genética ou infecciosa aparente.

Para o grupo de pacientes em estado estacionário, além dos critérios gerais, foram incluídas amostras de pacientes sem nenhuma crise vaso-oclusiva, internação ou transfusão 90 dias anteriores ao recrutamento.

Para o grupo de pacientes em crise vaso-oclusiva (CVO), além dos critérios gerais, foram incluídos pacientes maiores de 10 anos, que deram entrada na emergência da Fundação HEMOAM com crise algica grave caracterizada por dores em região lombar, quadril, óssea, articular ou abdominal sem outra causa aparente, identificado pelo paciente ou equipe médica da Fundação HEMOAM. Para aqueles pacientes que apresentaram mais de uma crise durante o período de coleta, foi elegível para este estudo apenas a amostra biológica coletada na primeira crise.

Para o grupo de pacientes na convalescença (CV), além dos critérios gerais, foram incluídas amostras biológicas dos pacientes do grupo de crise que receberam alta hospitalar da Fundação HEMOAM entre 30 e 90 dias após a alta hospitalar.

3.5.2. Critérios de não inclusão

Não foram incluídas amostras de pacientes heterocigotos devido às alterações de gravidade clínica e produção de mediadores biológicos diferentes, gestantes, indígenas ou amostras repetidas de um mesmo paciente.

3.5.3. Critérios de exclusão

Foram excluídas amostras inviáveis ou insuficientes para a dosagem das moléculas.

3.6. Procedimentos

3.6.1. Coleta de dados e material biológico

Os pacientes foram abordados no momento da internação (para o grupo de CVO) ou durante a consulta com um médico hematologista (para os grupos EE e CV). Os doadores foram recrutados antes da doação de sangue, na própria Fundação HEMOAM. Os projetos aos quais os pacientes e doadores seriam incluídos foi explicado, então, seguiu-se à coleta de dados sociodemográficos e clínicos pelos pesquisadores responsáveis, com posterior coleta do material biológico.

Os dados dos pacientes com crise vaso-oclusiva foram coletados dos prontuários físicos no Serviço de Atendimento Médico (SAME) da Fundação HEMOAM, enquanto os dados dos pacientes em estado estacionário foram coletados através de um questionário (Anexo 5.3.1), onde foram obtidos os dados de idade, gênero, endereço e medicamentos em uso. Os dados foram armazenados em planilhas do Microsoft Excel 2010.

Após adesão aos estudos, foram coletados 8mL do sangue periférico em 1 (um) tubo com EDTA para realização do hemograma 1 (um) tubo com Gel separador, para obtenção do soro e assim, dosagens das moléculas imunológicas. O recrutamento e coleta dos dados foram feitos no setor do Serviço de Atendimento Médico e Estatístico (SAME) e Internação da Fundação HEMOAM; A coleta do sangue foi feita no setor de Coleta do Laboratório de Análises Clínicas (LAC), para os pacientes em estado estacionário e convalescença, e Internação, para os pacientes em crise. O hemograma foi feito no setor de Hematologia com o equipamento ADVIA 2120i Hematology System (Siemens Healthcare Diagnosis), localizado na Fundação HEMOAM.

A amostra coletada no tubo com Gel Separador foi centrifugada para obtenção do soro, com posterior armazenamento a -80°C no laboratório Multidisciplinar da Fundação HEMOAM até a dosagem das citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e anafilotoxinas.

3.6.2. Dosagem das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento

Para cada um dos grupos de pacientes, serão dosadas as citocinas: Interleucina- 1β (IL- 1β), IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (CXCL8), IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, Interferon- γ (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α); quimiocinas: IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), MIP- 1α (CCL3), MIP- 1β (CCL4), PDGF-BB, RANTES (CCL5), VEGF, Eotaxina (CCL11), FGF Básico; e fatores de crescimento: Fator de Crescimento de Colônia de Granulócito (G-CSF [do inglês *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*]), Fator de Crescimento de Colônia de Granulócito-Macrófago (GM-CSF [do inglês *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*]) através da técnica de *Luminex*, que utiliza *beads* magnéticas com diferentes intensidades de fluorescência, conjugadas a

anticorpos específicos para cada molécula a ser analisada. Para este projeto foi utilizado o kit *The Bioplex-Pro Human Cytokine 27-Plex* da Bio-Rad, seguindo o protocolo e as recomendações do fabricante. A aquisição foi feita no equipamento *Luminex 200 System* da Fundação Oswaldo Cruz de Minas Gerais Instituto René Rachou (FIOCRUZ-MG) e analisadas pelo software *Bioplex Manager*. O resultado foi expresso em pg/ml e foi utilizado na construção do banco de dados.

3.6.3. Dosagem das anafilotoxinas

A dosagem das anafilotoxinas C3a, C4a e C5a foi feita através da técnica de *Cytometric Bead Array* (CBA), que utiliza *beads* com intensidades de fluorescência diferentes para cada analito, e que também são conjugadas a diferentes anticorpos específicos. Este procedimento foi realizado no laboratório Multidisciplinar da Fundação HEMOAM com o kit *The BD™ CBA Human Anaphylatoxin* da BD, seguindo o protocolo e recomendações do fabricante. A aquisição foi feita no citômetro de fluxo FACSCanto II da BD, no laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação HEMOAM. Os foram analisados no software *FCAP Array*, e para construção dos bancos de dados, o nível das moléculas foram expressos em pg/ml.

3.6.4. Análise de dados

Os resultados obtidos foram tabulados em planilhas digitais do software Microsoft Excel 2010, para posterior análise estatística e criação de tabelas. A primeira análise estatística foi feita através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e obtenção da mediana de cada parâmetro por grupo no software *GraphPad Prism v.5.0*. Para as variáveis sociodemográficas, a comparação foi feita pelo teste de Qui-Quadrado (χ^2), com intervalo de confiança de 95% e valor de p significativo quando menor que 0.05.

A comparação dos parâmetros hematológicos e das moléculas entre o grupo de doadores saudáveis (DS), pacientes em estado estacionário (EE) e crise vaso-oclusiva (CVO) foi realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de Múltiplas Comparações de Dunn,. Para comparação dos grupos de crise e pós-crise foi utilizado o teste de *Wilcoxon*, seguindo o intervalo de confiança de 95% e p significativo menor que 0.05. Todas estas análises também foram feitas no software *GraphPad Prism v.5.0*.

Para análise de correlação, foi utilizado o teste de correlação de *Spearman* para as células imunológicas e moléculas em cada subgrupo (DS, EE, CVO e CV) no software *GraphPad Prism v.5.0*, com o intervalo de confiança de 95% e p significativo para $p < 0.005$. O resultado da correlação obtido foi transferido para o Microsoft Excel 2010, e utilizado para

identificação do grau de correlação e significância. As correlações significativas foram utilizadas na construção das redes de células e moléculas no software *Cytoscape* v.3.7.2 (Cytoscape Consortium, San Diego, CA). Foi construída uma rede para o grupo de doadores e cada subgrupo de pacientes (EE, CVO e CV), onde cada parâmetro foi representado por um nóculo, enquanto a correlação foi representada por uma linha conectando ambos os nóculos. O valor absoluto do índice de correlação ($|r|$) foi utilizado para indicar a força de correlação, classificada em fraca ($|r| < 0$), moderada ($0.36 \geq |r| \leq 0.68$), e grave ($|r| > 0.68$) e representada pela espessura da linha. Já as correlações positivas e negativas foram representadas por linhas contínuas ou pontilhadas, respectivamente, como proposto por Taylor (65).

Os níveis das moléculas em pg/ml foram utilizados na construção dos *heatmaps*, com a função *heatmap.2* no software R (Project for Statistical Computing Version 3.0.1) e pacote *gplots*. As árvores de decisão foram construídas no software WEKA (Waikato Environment for Knowledge Analysis, version 3.6.11, University of Waikato, New Zealand) para classificar os pacientes com base nos marcadores imunológicos.

A mediana geral de cada molécula para os grupos DS, EE e CVO foi calculada e usada como ponto de cut-off, expressa em pg/ml (IL-1 β = 1.12; IL-1ra = 29.11; TNF- α = 12.12; IL-6 = 1.12; IL-7 = 2.82; IL-12p70 = 2.40; IL-2 = 0.44; IFN- γ = 15.85; IL-4 = 0.53; IL-5 = 2.93; IL-13 = 0.70; IL-17A = 6.74; IL-10 = 5.20; CXCL10 = 69.68; CXCL8 = 2.64; PDGF-BB = 292.0; CCL3 = 0.96; CCL4 = 10.74; CCL2 = 9.07; CCL5 = 57.0; VEGF = 9.08; GM-CSF = 7.81; G-CSF = 1.24; FGFb = 3.64; CCL11 = 23.14; C3a = 10.03; C4a = 7.61; C5a = 316.9). O valor obtido foi utilizado para classificar os pacientes e consequentemente cada grupo em “Alto” ou “Baixo” produtores de cada molécula. O valor percentil foi calculado e posteriormente apresentado em um Diagrama de Venn quando maior que 50%. O diagrama foi realizado em um site público (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) para identificação das interseções em cada grupo e descrição das moléculas como elementos.

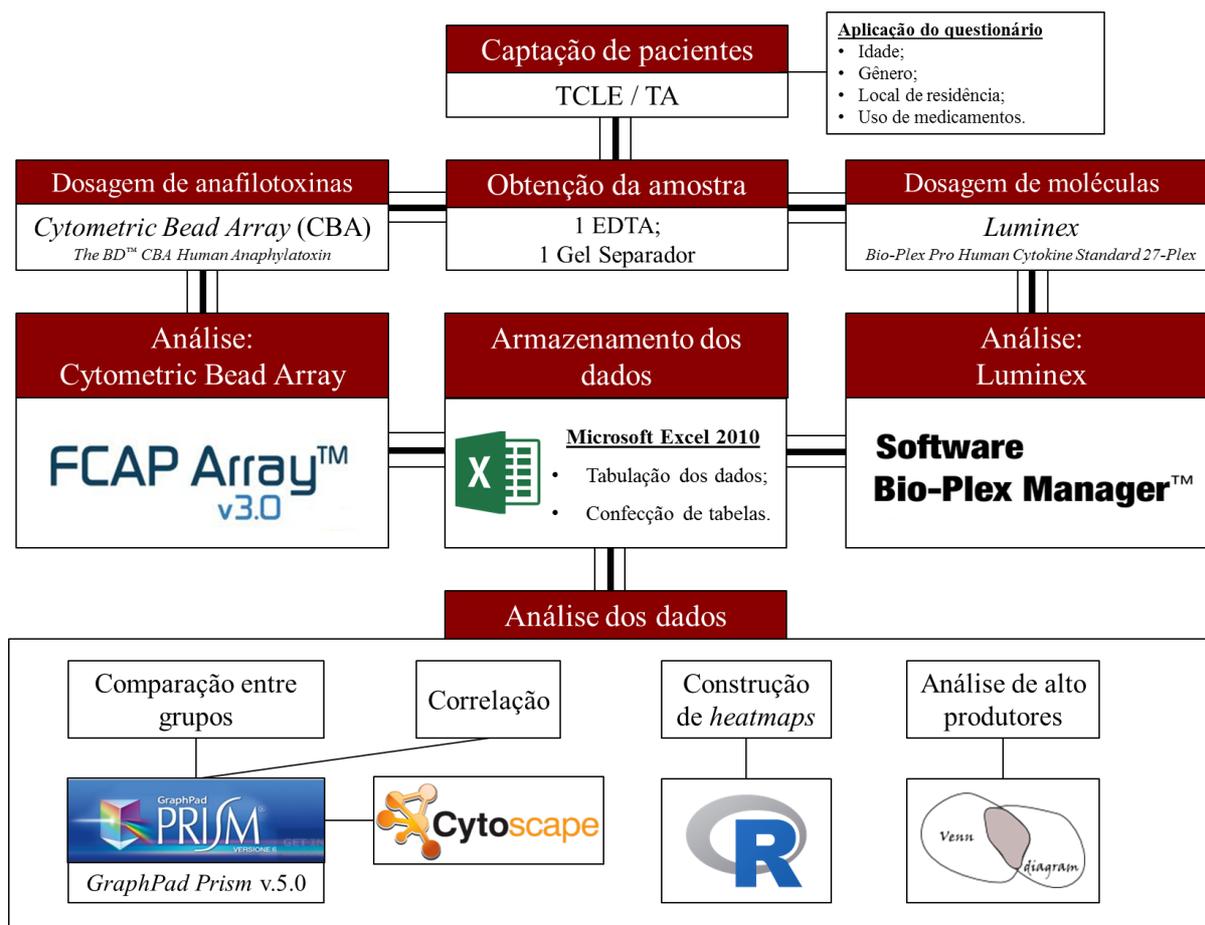


Figura 6: Procedimento de coleta das amostras biológicas, dosagem das proteínas solúveis e tratamento dos dados.

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; TA: Termo de Assentimento.

3.7. Riscos e benefícios

Este projeto não apresentou risco ao paciente, uma vez que não houve mais coletas de material biológico. Nenhum dos pacientes que participaram dos estudos apresentou qualquer complicação, como hematoma, equimose (mancha arroxeadada) no local da picada da agulha, ou qualquer desconforto. As coletas foram realizadas por profissionais qualificados da Fundação HEMOAM que estavam à disposição para dar o devido suporte caso houvesse alguma intercorrência durante a aquisição das amostras biológicas.

Os resultados obtidos neste estudo irão contribuir para a melhor compreensão do estado inflamatório de pacientes com anemia falciforme em diferentes momentos clínicos, além de identificar possíveis marcadores imunológicos e a relação das moléculas no desenvolvimento de crises vaso-oclusivas. Estes dados podem contribuir com testes de acompanhamento laboratorial e clínico, de forma a contribuir com a profilaxia às crises.

4. RESULTADOS

4.1. Dados sócio-demográficos e laboratoriais

Nossos resultados epidemiológicos mostraram uma diferença significativa na variável idade entre os quatro grupos analisados ($p = 0.0324$). Foi observada maior mediana de idade nos o grupo DS e EE, enquanto o grupo de CVO e CV tiveram uma mediana de idade menor, embora o intervalo interquartil 25 e 75 apresentaram uma variação menor nos dois primeiros grupos, quando comparados aos dois últimos (Tabela 1).

Foi observado que o gênero feminino representou 30% no grupo DS, enquanto foi a maioria (67%) no grupo EE ($p = 0.0165$). O grupo de CVO e CV apresentou a mesma porcentagem para ambos os gêneros, e sem diferença significativa quando comparados aos outros grupos (Tabela 1).

Não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação à cidade de residência, embora tenha havido uma maior porcentagem de indivíduos residentes na capital do estado, Manaus. Mais de 75% dos pacientes estavam em uso crônico de ácido fólico, enquanto mais de 50% estava em uso de hidroxiuréia. Devido à ausência de pacientes em uso de corticoide, não foi possível realizar a análise estatística para comparar os grupos, sendo feita apenas uma comparação descritiva dos resultados obtidos, descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição epidemiológica das variáveis de idade, gênero, cidade de residência e tratamento farmacológico crônico entre os grupos DS, EE, CVO e CV, com respectiva diferença significativa

Variáveis	DS n = 53	EE n = 27	CVO n = 22	CV n = 22	p value
Idade (anos, mediana [IQR])	30 [23-42]	30 [22-34]	22 [14-34]	22 [14-34]	0.0324
Gênero, n (%)					
Masculino	37 (70)	9 (37)	11 (50)	11 (50)	0.0165^a
Feminino	16 (30)	18 (67)	11 (50)	11 (50)	
Cidade de Residência, n (%)					
Manaus-AM	53 (100)	23 (85)	20 (91)	20 (91)	0.0632
Interior do Amazonas	-	4 (15)	2 (9)	2 (9)	
Tratamento farmacológico Crônico, n (%)					
Ácido Fólico	-	25 (92.6)	17 (77.3)	17 (77.3)	
Hidroxiuréia	-	22 (81.5)	14 (63.6)	14 (63.6)	
Analgésico	-	12 (44.4)	12 (54.5)	12 (54.5)	
Corticoide	-	2 (7.4)	-	-	
Anti-inflamatório	-	1 (3.7)	5 (22.7)	5 (22.7)	

DS: Grupo de Doadores Saudáveis; EE: Grupo em Estado Estacionário; CVO: Grupo em Crise Vaso-Oclusiva; CV: Grupo em Convalescença.

^aDiferença significativa entre os grupos DS e EE; ^bDiferença significativa entre os grupos DS e CVO; ^cDiferença significativa entre os grupos EE e CVO; ^dDiferença significativa entre os grupos CVO e CV.

Análise estatística feita pelo teste *Kruskal-Wallis* e pós teste de Múltiplas Comparações de Dunn para a idade. Para comparação do gênero e cidade de residência, foi utilizado o teste Qui-Quadrado (χ^2). Para ambos, foi considerado significativo quando $p < 0.05$. Devido à ausência de pacientes dos grupos de CVO e CV em uso de corticoide, não foi possível realizar o χ^2 .

Ao comparar os dados hematológicos dos doadores saudáveis (DS) com pacientes em estado estacionário, foi observada uma queda significativa de RBC, hemoglobina, hematócrito e CHCM ($p = 0.0057$), enquanto houve um aumento dos níveis de VCM, HCM ($p = 0.0008$), RDW e reticulócitos, com valor de $p < 0.0001$ para maioria dos parâmetros. Embora a mediana de linfócitos do grupo EE tenha sido maior que no grupo DS ($p < 0.0001$), não houve diferença significativa entre os leucócitos totais entre os dois grupos. O envolvimento plaquetário no grupo EE foi evidente, com aumento estatístico no grupo EE ($p < 0.0001$).

Foi observada uma queda significativa no VCM no grupo CVO, quando comparado ao EE ($p < 0.0001$). Além disso, encontramos um aumento dos leucócitos totais no grupo CVO ($p < 0.0001$), que parece mediado pelo nível de neutrófilos ($p < 0.0001$) e monócitos ($p < 0.0001$), enquanto houve uma queda significativa no valor dos basófilos (Tabela 2).

Após a crise, descrita no grupo de CVO, os pacientes, descritos no grupo CV, apresentaram um aumento de hematócrito e queda dos neutrófilos, demonstrando uma regulação da inflamação mediada pela resposta imunológica. As medianas, intervalos interquartis 25 e 75 dos parâmetros hematológicos dos quatro grupos estão apresentadas na Tabela 2, com respectiva diferença estatística e valor de p .

Tabela 2: Dados laboratoriais dos grupos DS, EE, CVO e CV.

Variáveis	DS n = 53	EE n = 27	CVO n = 22	CV n = 22	p value
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$, mediana [IQR])	4.99 [4.59-5.40]	2.51 [2.19-2.75]	2.39 [2.09-2.94]	2.65 [2.29-3.12]	$< 0.0001^{a,b}$
Hemoglobina (g/dL, mediana [IQR])	14.90 [13.55-15.95]	8.0 [7.10-9.0]	7.50 [6.20-8.45]	8.30 [7.20-8.70]	$< 0.0001^{a,b}$
Hematócrito (% , mediana [IQR])	43.70 [40.45-47.30]	24.50 [21.70-28.50]	22.0 [18.60-25.0]	24.80 [21.95-26.68]	$< 0.0001^{a,b,d}$
VCM (fL, mediana [IQR])	87.80 [84.85-90.4]	99.90 [92.80-110.2]	91.30 [79.60-99.80]	90.55 [86.83-99.15]	$< 0.0001^{a,c}$
HCM (pg, mediana [IQR])	29.70 [28.90-30.60]	32.10 [30.30-36.70]	31.10 [27.35-33.20]	29.70 [27.58-34.03]	0.0008^a
CHCM (g/dL, mediana [IQR])	34.10 [33.10-34.60]	32.70 [31.90-34.10]	33.60 [32.90-34.05]	33.15 [32.40-33.95]	0.0057^a
RDW (fL, median [IQR])	13.70 [12.95-13.95]	18.20 [17.30-19.80]	21.20 [19.65-23.80]	19.95 [18.08-22.90]	$< 0.0001^{a,b}$

Reticulócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$, mediana [IQR])	72.70 [56.90-88.80]	367.6 [226.0-529.9]	257.4 [134.3-349.2]	248.6 [134.5-332.8]	$< 0.0001^{a,b}$
Leucócitos Totais ($\times 10^6/\mu\text{L}$, mediana [IQR])	6.33 [5.27-7.10]	7.42 [5.95-9.44]	11.39 [8.82-15.17]	9.51 [8.07-11.38]	$< 0.0001^{b,c}$
Neutrófilo ($\times 10^3/\mu\text{L}$, mediana [IQR])	3.43 [2.80-4.18]	3.39 [2.13-4.81]	6.90 [4.87-9.46]	4.88 [3.05-6.43]	$< 0.0001^{b,c,d}$
Linfócito ($\times 10^3/\mu\text{L}$, mediana [IQR])	1.84 [1.55-2.16]	2.41 [2.13-3.36]	3.02 [2.32-4.78]	3.28 [2.43-4.96]	$< 0.0001^{a,b}$
Monócito ($\times 10^3/\mu\text{L}$, mediana [IQR])	0.38 [0.29-0.41]	0.43 [0.33-0.69]	0.66 [0.52-0.86]	0.60 [0.41-0.83]	$< 0.0001^{b,c}$
Basófilo ($\times 10^3/\mu\text{L}$, mediana [IQR])	0.03 [0.02-0.05]	0.03 [0.03-0.05]	0.00 [0.00-0.03]	0.00 [0.00-0.04]	$0.0002^{b,c}$
Eosinófilo ($\times 10^3/\mu\text{L}$, mediana [IQR])	0.19 [0.12-0.41]	0.24 [0.13-0.50]	0.22 [0.10-0.62]	0.42 [0.24-0.62]	0.6031
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$, mediana [IQR])	244 [213-281.5]	420 [372-533]	411 [326-530]	460.5 [339.8-642.0]	$< 0.0001^{a,b}$

DS: Grupo de Doadores Saudáveis; EE: Grupo em Estado Estacionário; CVO: Grupo em Crise Vaso-Oclusiva; CV: Grupo em Convalescença.

^aDiferença significativa entre os grupos DS e EE; ^bDiferença significativa entre os grupos DS e CVO; ^cDiferença significativa entre os grupos EE e CVO; ^dDiferença significativa entre os grupos CVO e CV.

Análise estatística feita pelo teste *Kruskal-Wallis* e pós-teste de Múltiplas Comparações de Dunn.

4.2. Perfil das moléculas imunológicas entre o grupo controle e subgrupos de pacientes com anemia falciforme

A concentração das citocinas foi dosada em todos os grupos e expressos em pg/ml nos gráficos (Figura 7). Ao comparar os grupos controle com os pacientes em estado estacionário, foi observado um aumento significativo da IL-1 β ($p < 0.0001$), IL-12p70 ($p < 0.005$), IL-17A ($p < 0.0001$) e IL-10 ($p < 0.0001$). Não foi observada diferença significativa na concentração das outras citocinas entre os grupos controle, com os subgrupos EE.

Já ao comparar o grupo controle com os pacientes falciformes em crise vaso-oclusiva, foi identificado aumento significativo da concentração de IL-1ra ($p < 0.0001$), IL-7 ($p < 0.0001$), IL-2 ($p < 0.0001$), IL-4 ($p < 0.0001$), IL-5 ($p < 0.0001$), IL-13 ($p < 0.05$) e IL-10 ($p < 0.001$). Além disso, foi observada concentração significativamente mais baixa de IL-1 β ($p < 0.0001$), TNF- α ($p < 0.0001$), IL-12p70 ($p < 0.0001$), IFN- γ ($p < 0.0001$) e IL-17A ($p < 0.0001$) no grupo de CVO, quando comparados aos doadores saudáveis.

Na avaliação da concentração das citocinas circulantes entre os pacientes em estado estacionário e crise vaso-oclusiva, foi identificado um aumento significativo da IL-1 β ($p < 0.0001$), TNF- α ($p < 0.0001$), IL-12p70 ($p < 0.0001$), IFN- γ ($p < 0.0001$), IL-17A ($p < 0.0001$) e IL-10 ($p < 0.0001$) no grupo de pacientes EE. Em contrapartida, foram identificados maiores concentrações de IL-1ra ($p < 0.0001$), IL-7 ($p < 0.0001$), IL-2 ($p <$

0.0001), IL-4 ($p < 0.0001$) e IL-5 ($p < 0.05$) no grupo de pacientes CVO. Não foi observada diferença significativa na concentração da IL-6 em nenhum grupo.

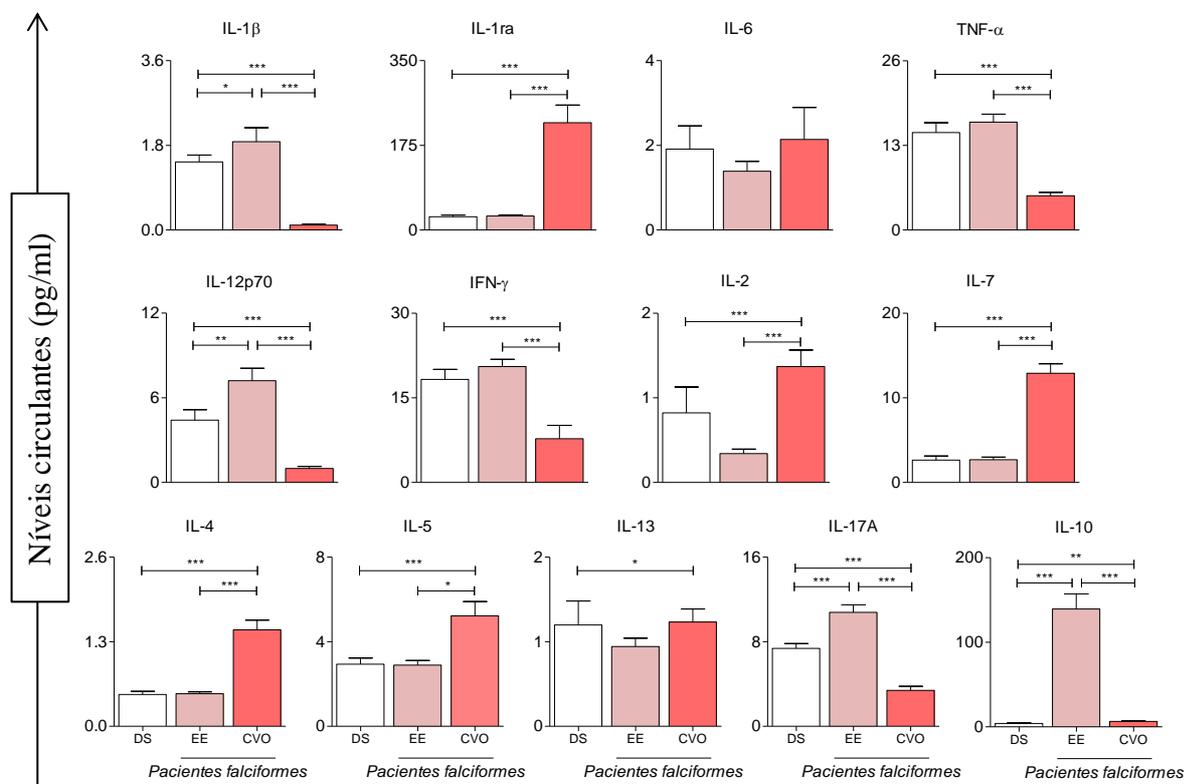


Figura 7: Concentrações circulantes das citocinas entre os grupos DS, EE e CVO.

DS: Grupo de Doadores Saudáveis; EE: Grupo em Estado Estacionário; CVO: Grupo em Crise Vaso-Oclusiva.

Análise estatística feita pelo teste *Kruskal-Wallis* e pós-teste de Múltiplas Comparações de Dunn.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

À análise quantitativa das quimiocinas circulantes entre o grupo DS e o subgrupo EE, foi possível identificar que há um aumento significativo da concentração de CXCL8, CXCL10, CCL3, CCL4 e CCL5 ($p < 0.0001$) em pacientes com anemia falciforme, independente do estado clínico, quando comparados a doadores saudáveis. Não houve diferença estatística na concentração de CCL11 somente entre o grupo controle e o subgrupo EE. A concentração das quimiocinas com respectiva análise estatística está representada na Figura 8.

Embora os pacientes falciformes apresentem maior concentração de quimiocinas circulantes, não foi identificada diferença significativa nos níveis de CCL2. Além disso, ao analisar os subgrupos dos pacientes falciformes, pode-se observar que o estado vaso-oclusivo apresentou maior concentração de CCL3 ($p < 0.001$), CCL5 ($p < 0.0001$) e CCL11 ($p < 0.05$), quando comparados ao grupo de pacientes em estado estacionário.

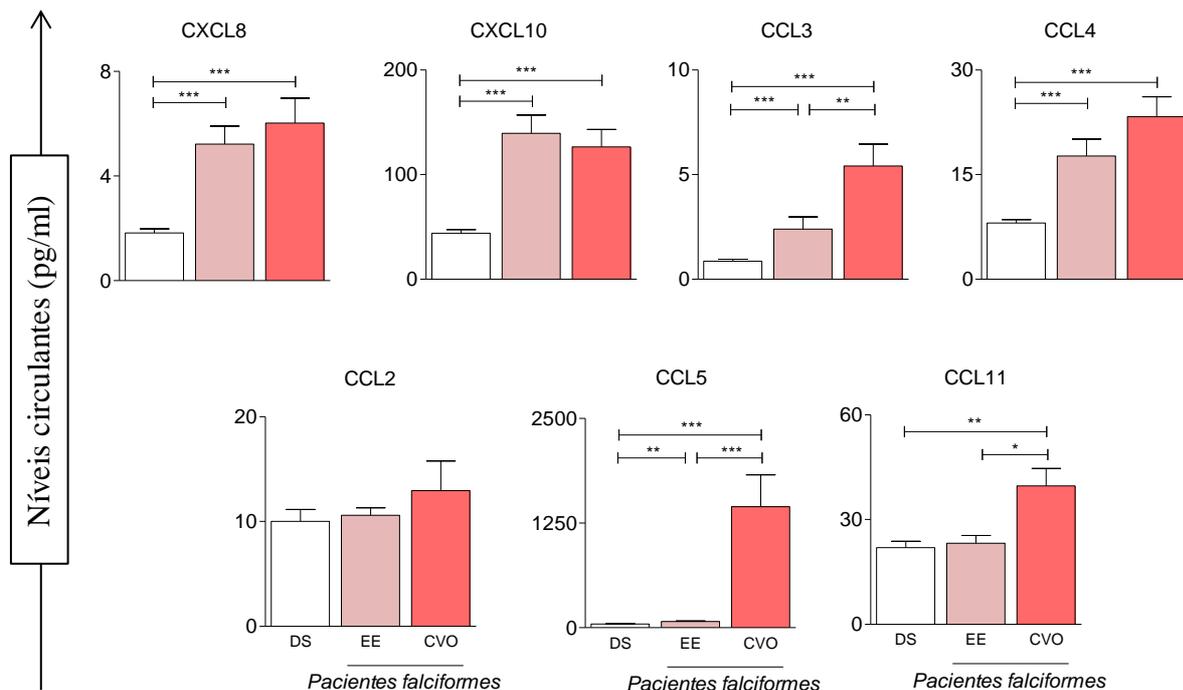


Figura 8: Concentrações circulantes das quimiocinas entre os grupos DS, EE e CVO.

DS: Grupo de Doadores Saudáveis; EE: Grupo em Estado Estacionário; CVO: Grupo em Crise Vaso-Oclusiva.

Análise estatística feita pelo teste *Kruskal-Wallis* e pós-teste de Múltiplas Comparações de Dunn.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

As análises dos níveis circulantes dos fatores de crescimento estão descritas na Figura 9. Entre os grupos DS e EE, foi identificado um aumento significativo na concentração circulante de VEGF ($p < 0.001$) e GM-CSF ($p < 0.05$) no grupo de pacientes em estado estacionário. Já entre os grupos DS e CVO, foram observados maiores concentrações de VEGF ($p < 0.0001$), PDGF-BB ($p < 0.0001$) e G-CSF ($p < 0.0001$) nos pacientes em crise vaso-oclusiva. Concentrações estatisticamente baixas de GM-CSF foram descritas em pacientes em CVO, quando comparados ao grupo DS ($p < 0.0001$).

Dentre os pacientes falciformes (EE e CVO), foi observado aumento significativo na concentração de VEGF ($p < 0.001$), PDGF-BB ($p < 0.05$) e G-CSF ($p < 0.0001$) em pacientes em crise vaso-oclusiva. Além disso, pacientes em estado estacionário apresentaram dados quantitativos estatisticamente maiores de GM-CSF ($p < 0.0001$), quando comparados aos pacientes em CVO.

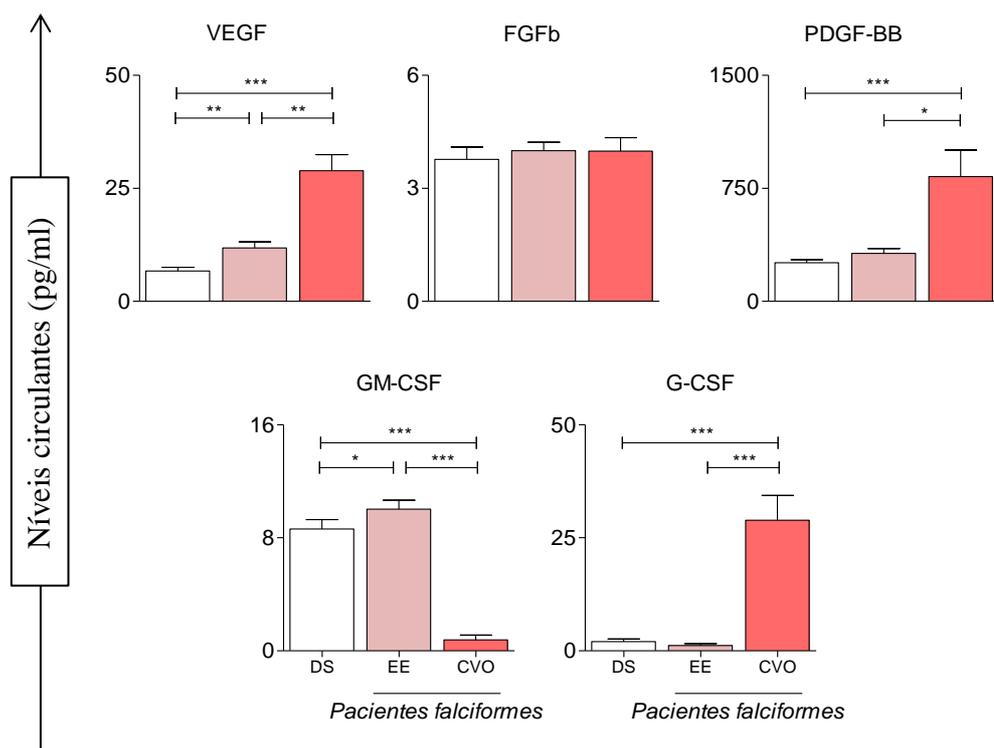


Figura 9: Concentrações circulantes dos fatores de crescimento entre os grupos DS, EE e CVO. DS: Grupo de Doadores Saudáveis; EE: Grupo em Estado Estacionário; CVO: Grupo em Crise Vaso-Oclusiva.

Análise estatística feita pelo teste *Kruskal-Wallis* e pós-teste de Múltiplas Comparações de Dunn. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

Ao comparar a concentração circulante de C3a entre os grupos, foram observados maiores concentrações nos pacientes falciformes, embora houvesse uma diferença estatisticamente significativa apenas entre o grupo controle e os pacientes em estado estacionário ($p < 0.0001$). A análise quantitativa das anafilotoxinas dosadas entre os grupos está representada na Figura 10.

Foi identificado um aumento significativo na concentração de C4a nos pacientes em estado estacionário, quando comparados aos indivíduos saudáveis ($p < 0.0001$) e aos pacientes em crise ($p < 0.05$). Além disso, também foi identificado um aumento significativo na quantidade sérica de C4a nos pacientes em crise, quando comparados aos doadores saudáveis ($p < 0.05$).

Embora pacientes do grupo EE tenham apresentado concentração elevada de C5a, em comparação aos grupos DS e CVO, foi identificada diferença significativa apenas para os pacientes em crise ($p < 0.0001$). Ainda, também foi observado uma queda significativa de C5a nos pacientes em crise, quando comparados ao grupo de doadores saudáveis ($p < 0.001$).

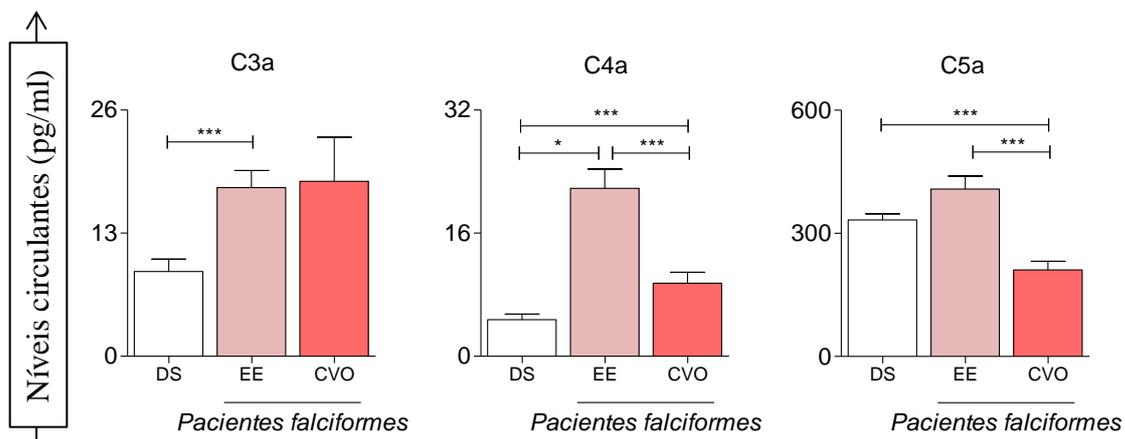


Figura 10: Concentrações circulantes das anafilotoxinas entre os grupos DS, EE e CVO.

DS: Grupo de Doadores Saudáveis; EE: Grupo em Estado Estacionário; CVO: Grupo em Crise Vaso-Oclusiva.

Análise estatística feita pelo teste *Kruskal-Wallis* e pós-teste de Múltiplas Comparações de Dunn.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

4.3. Perfil de moléculas após crise vaso-oclusiva

Os pacientes recrutados para o grupo de crise vaso-oclusiva foram acompanhados de forma longitudinal, com mais uma coleta do sangue periférico no período entre 30 e 120 dias após a alta hospitalar. O tempo mediano entre a primeira e a segunda coleta foi de 53 dias. A Figura 11 traz a representação gráfica dos níveis médios de cada molécula, com respectivo gráfico *Before & After* para cada paciente e molécula incluída na análise longitudinal. Os intervalos interquartis 25 e 75 do grupo controle foram utilizados para sombreamento no fundo de cada gráfico. Nenhum paciente do grupo CV apresentou qualquer sintoma ou complicação clínica no período entre a alta hospitalar e a segunda coleta de sangue.

Ao comparar o grupo de crise com a convalescença, foi identificada uma queda na concentração de várias moléculas, entretanto, esta redução foi significativa apenas para CXCL8 ($p < 0.05$), CCL4 ($p < 0.05$), IL-1ra ($p < 0.05$) e PDGF-BB ($p < 0.001$).

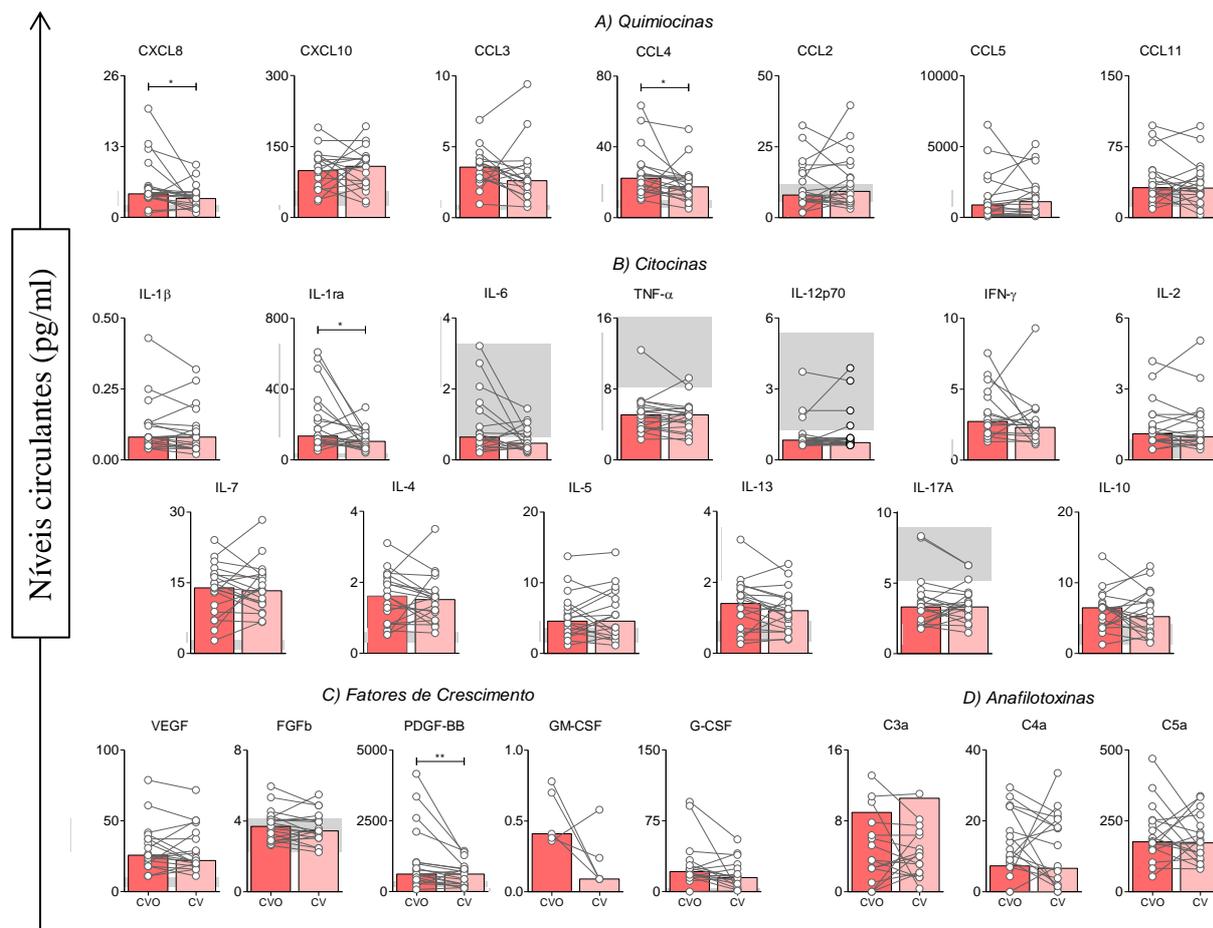


Figura 11: Comparação das moléculas entre os grupos CVO e CV. CVO: Grupo em Crise Vaso-Oclusiva; CV: Grupo em Convalescença. Análise estatística feita pelo teste de Wilcoxon. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

4.4. Correlação das células e moléculas imunológicas com base nos subgrupos

A análise de correlação das moléculas imunológicas permitiu identificar que indivíduos do grupo de doadores saudáveis apresentaram uma forte correlação entre $TNF-\alpha/IL-2$ ($r = 0.746$; $p < 0.0001$), $IL-12/IL-10$ ($r = 0.796$; $p < 0.0001$), $IL-12/VEGF$ ($r = 0.729$; $p < 0.0001$), $IL-5/G-CSF$ ($r = 0.686$; $p < 0.0001$) e $IL-10/VEGF$ ($r = 0.702$; $p < 0.0001$). Outras correlações fracas e moderadas, com valor significativo, estão descritas na Figura 12A.

Os pacientes em estado estacionário apresentaram correlações fortes entre as moléculas de $IL-12p70/VEGF$ ($r = 0.838$; $p < 0.0001$), $IL-17/CCL4$ ($r = 0.839$; $p < 0.0001$) e $IL-10/CXCL10$ ($r = 1.000$; $p < 0.0001$). As outras correlações significativas fracas e moderadas estão representadas na Figura 12D.

Indivíduos do grupo CVO tiveram mais correlações fortes entre as moléculas, quando comparados aos pacientes em estado estacionário, no entanto, pôde-se ver que algumas moléculas apresentaram grande quantidade de correlações com outras moléculas, são elas:

IL-1 β , IL-7, IL-4, IL-5, IL-13 e FGFb. Foi observada apenas uma correlação negativa entre a IL-1ra e GM-CSF ($r = -0.857$; $p = 0.0238$). As outras correlações fracas e moderadas, mas significativas do grupo CVO estão representadas na Figura 12B.

Muitas das correlações fortes e significativas observadas no grupo CVO ainda prevaleceram no grupo CV. Muitas moléculas, principalmente IL-1 β , IL-4, IL-5 e IL-17 ainda permanecem com grandes quantidades de correlações com outras moléculas imunológicas. Outras correlações significativas moderadas e fracas entre as moléculas estão representadas na Figura 12C.

As relações significativas e fortes de TNF- α /IL-2 e IL-5/G-CSF, observadas no grupo de indivíduos saudáveis, não foi significativa nos pacientes EE, entretanto, foi observada correlação moderada e significativa nos pacientes do grupo CVO, que permaneceu significativa nos pacientes do grupo CV. Além disso, a correlação IL-12p70/VEGF foi significativa e forte em indivíduos saudáveis e pacientes do grupo EE. A relação IL-10/VEGF, forte e significativa no grupo DS, foi significativa, mas moderada nos pacientes do grupo EE.

Foi observado que a interação moderada entre a IL-17/CCL4, observada nos pacientes do grupo CVO, se mantém moderada no grupo CV, atingindo uma correlação forte apenas no grupo EE. Além disso, a correlação positiva e forte de IL-10/CXCL10 foi significativa apenas no grupo EE, não sendo significativa na crise e nem na convalescença. Embora a interação IL-12p70/VEGF não tenha sido significativa em indivíduos do grupo CVO, houve significância estatística e moderada na fase de convalescença, e forte em pacientes do grupo EE.

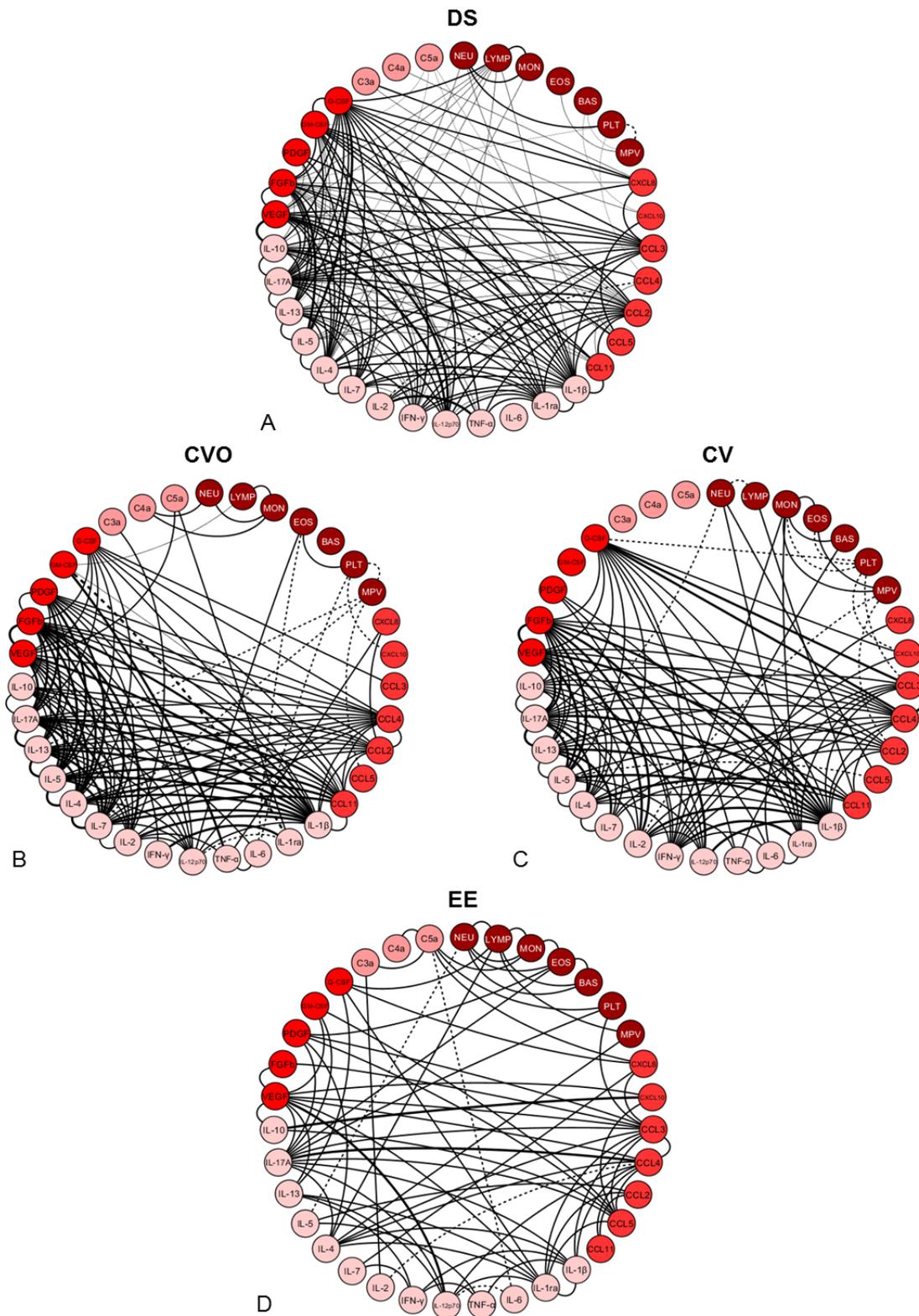


Figura 12: Correlação entre as moléculas e células imunológicas para os grupos DS, EE, CVO e CV. DS: Grupo de Doadores Saudáveis; EE: Grupo em Estado Estacionário; CVO: Grupo em Crise Vaso-Oclusiva; CV: Grupo em Convalescência. Análise estatística feita pelo teste de correlação de *Spearman*, com representação das correlações significativas ($p < 0.05$).

4.5. Análise de alto produtores em doadores saudáveis e subgrupos de pacientes com anemia falciforme

O diagrama de Venn foi utilizado para apresentar o resultado da análise de alto produtores, descrito na Figura 13. Não foi encontrada nenhuma interseção compartilhada para os pacientes com anemia falciforme e o grupo controle, e nem exclusiva do grupo controle. Entretanto, foram identificadas três interseções compartilhadas entre os doadores saudáveis e os pacientes falciformes em estado estacionário, sendo eles IL-6, TNF- α e C5a.

O grupo EE demonstrou ser alto produtor de 22 interseções, sendo três compartilhadas com o grupo DS (descrito acima), 13 compartilhadas com o grupo CVO e seis exclusivas do estado estacionário. As moléculas que se mostraram em alta produção apenas no grupo EE foram CCL2, IL-1 β , L-12p70, IFN- γ , IL-17A e GM-CSF. Já as moléculas em alta produção compartilhadas com o grupo de pacientes em CVO foram CXCL8, CXCL10, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, IL-1ra, IL-13, IL-10, VEGF, FGFb, C3a e C4a.

À análise de alto produtores do grupo de pacientes em crise foi possível identificar 19 moléculas, mas apenas seis interseções apenas para o grupo CVO, cujos elementos foram IL-4, IL-5, IL-2, IL-7, PDGF-BB e G-CSF.

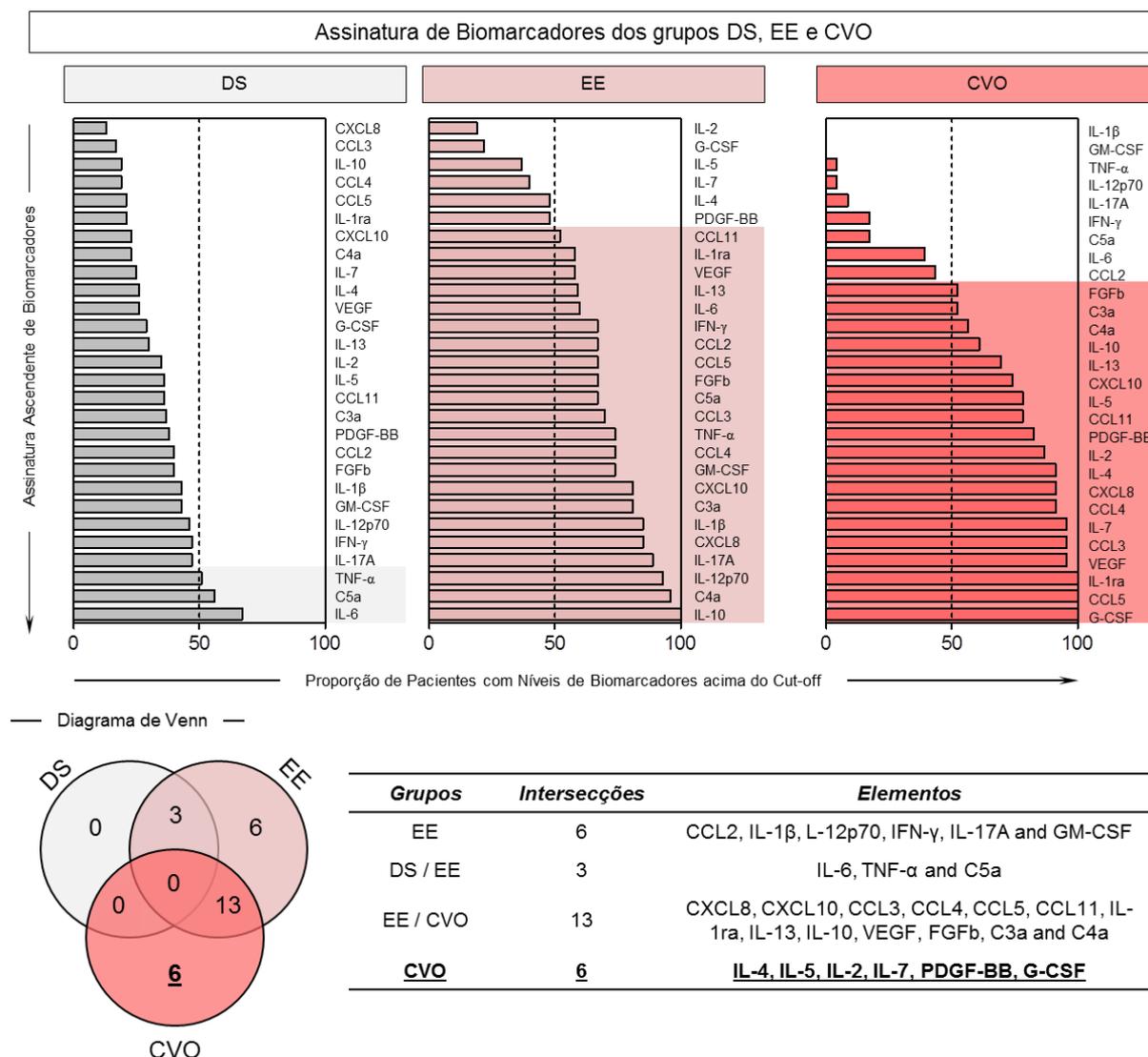


Figura 13: Análise de alto produtores com base nos grupos controle (DS) e de pacientes falciformes EE e CVO, demonstrado pela assinatura de biomarcadores e Diagrama de Venn. DS: Grupo de Doadores Saudáveis; EE: Grupo em Estado Estacionário; CVO: Grupo em Crise Vaso-Oclusiva.

4.6. Análise de correlação entre as moléculas com os perfis clínicos e árvores de decisão

Com o objetivo de evidenciar as correlações das moléculas com os perfis clínicos, foram produzidos heatmaps com análise de bioinformática. A análise demonstrou melhor clusterização dos pacientes baseados nos indivíduos saudáveis (DS) em comparação com os pacientes em EE (Figura 14A) e CVO (Figura 14B).

Além disso, as árvores de decisão foram criadas com base no perfil de moléculas capazes de diferenciar os estados EE e CVO do grupo controle, com base na concentração das moléculas imunológicas.

As árvores demonstraram que níveis séricos de IL-10 quando maiores que 17.56 pg/ml, em conjunto com níveis menores de IL-1ra (≤ 62.88 pg/ml) permite a caracterização do indivíduo em estado estacionário. Enquanto que níveis maiores que 0.43 pg/ml de IL-1 β demonstram um perfil clínico de crise vaso-oclusiva. Já a IL-1 β se mostrou um marcador para classificação quanto ao grupo controle e de pacientes falciformes em crise álgica. A análise da árvore de decisão para os pacientes em crise mostrou que níveis maiores que 0.43 pg/ml permite caracterizar os pacientes em quadro de crise vaso oclusiva.

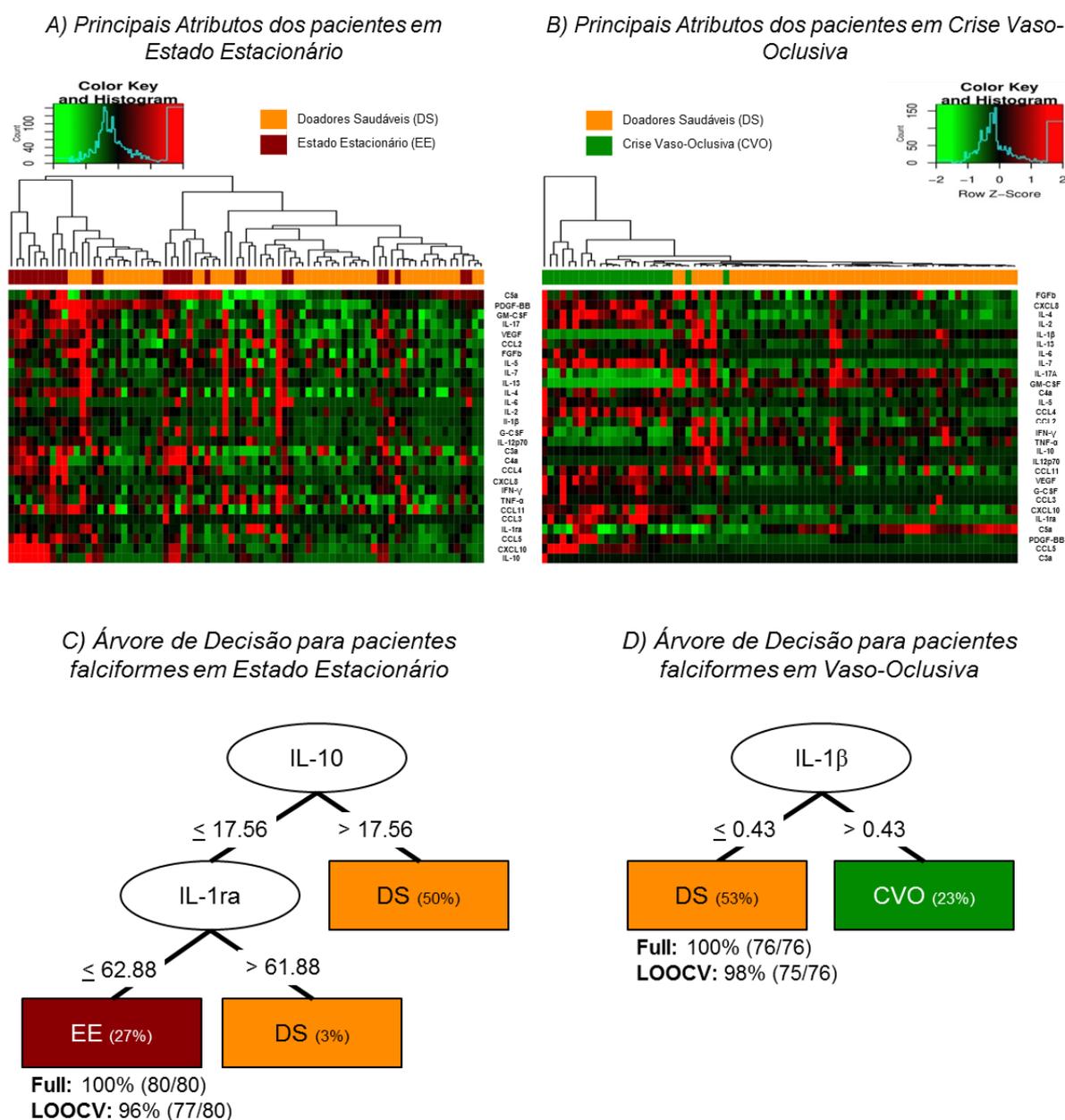


Figura 14: Análise bioinformática de moléculas séricas divididas em atributos do grupo controle e subgrupos de pacientes falciformes seguindo condições clínicas, representadas por heatmaps e árvores de decisão com base no z score.

Os atributos demonstraram habilidade de classificar indivíduos saudáveis e pacientes falciformes em EE; B) Análise do heatmap demonstra maior habilidade em distinguir controles e pacientes em CVO; C) Análise da árvore de decisão demonstra a classificação baseado na concentração circulante de IL-10 para categorizar em DS se > 61.88 pg/ml ou em EE se < 62.88 pg/ml; D) Análise da árvore de decisão permite a classificação de DS e CVO baseado na concentração circulante de IL-1 β para categorizar indivíduos em DS se < 0.43 pg/ml ou em CVO se > 0.43 pg/ml.

DS: Grupo de Doadores Saudáveis; EE: Grupo em Estado Estacionário; CVO: Grupo em Crise Vaso-Oclusiva. LOOCV: *Leave-one-out Cross Validation*.

5. DISCUSSÃO

A anemia falciforme é a principal doença genética distribuída no Brasil e no mundo, e embora já seja estabelecida a importância dos mediadores inflamatórios no quadro fisiopatológico, compreender e estabelecer biomarcadores ainda é um desafio à ciência. A análise da participação de células e moléculas é imprescindível para melhor compreender os fundamentos básicos envolvidos na patogênese falciforme, para então, propor melhorias de acompanhamento laboratorial e terapêutico. Sabe-se que a inflamação é um marco importante no quadro fisiopatológico da anemia falciforme, e é marcada principalmente pela interação de neutrófilos, monócitos, plaquetas e hemácias falcizadas, e conduzida por moléculas solúveis que possuem um papel fundamental na apresentação clínica de crise vaso-oclusivas.

Muitos estudos descrevem os níveis destas moléculas de forma separada, além de relacioná-las com as diferentes apresentações clínicas, entretanto muito se diverge quando referente a marcadores imunológicos em pacientes com anemia falciforme. Neste estudo, propusemos a análise quantitativa sérica e bioinformática de 28 moléculas do sistema imunológico cuja função está estabelecida dentro do processo inflamatório, mas nunca descrita a relação de todas entre os estados clínicos do paciente, e nem entre si.

Embora tenhamos encontrado diferença significativa entre os pacientes incluídos em nosso estudo, a média de idade foi de 30 anos para pacientes em estado estacionário, e 22 anos para pacientes em crise. No estudo de Cesar et al. (19), foi observada uma média de 15 anos. Vale ressaltar que: 1) A população de pacientes incluída neste estudo, e no de Cesar et al. é proveniente do mesmo hospital, embora nossa amostra tenha sido menor, frente às populações de pacientes com a doença falciforme (heterozigotos e homozigotos); e 2) Nosso critério de inclusão foram pacientes homozigotos, maiores de 18 anos (para estacionário) e 10 anos (para crise). Acreditamos que o modelo de desenho do estudo possa ter contribuído nesta diferença entre a média de idades.

A população de doentes falciformes atendidos no hospital de referência se mostrou mais frequente no sexo masculino (19). Entretanto, tivemos maior frequência do público feminino na fase estacionária, com uma proporção de 2 mulheres para 1 homem, enquanto houve uma equiparação de 1 mulher para 1 homem no estado de crise. Acreditamos que vários fatores podem estar ligados ao maior envolvimento dos homens no estado de crise, como a interação com os fatores ambientais, principalmente devido aos riscos de exposição à poeira, doenças infecciosas e tabaco (8). Não há descrição dos fatores ambientais com o desenvolvimento de crise vaso-oclusiva na nossa região, o que salienta a necessidade de mais estudos de cunho

epidemiológico e ambiental para determinar a causalidade entre os fatores ambientais e o desenvolvimento de crises.

Considerando a distribuição geográfica dos pacientes no estado do Amazonas, observamos que não houve diferença significativa entre os indivíduos que residiam na capital do estado, e nas cidades do interior, entre os quatro grupos analisados. Acreditamos que a alta frequência de pacientes em estado estacionário no interior se dê por conta da estabilidade da doença, e sua relação com a comodidade ao residir em locais mais distantes do centro de atendimento médico. Em contrapartida, alguns pacientes falciformes tendem a apresentar um quadro patológico advindo da doença, como priapismo, colelitíase e outros (19), o que remete à constante necessidade de atendimento hospitalar.

Mais de 60% dos pacientes de ambos os grupos (EE e CVO) estavam sob uso de ácido fólico e hidroxiuréia. Ambos são medicamentos comuns no tratamento dos pacientes com anemia falciforme, devido ao quadro patológico e corrobora com o encontrado na população de doentes falciformes descrito por Cesar et al. (19). Sabe-se que estes tipos de medicamentos contribuem com a prevenção das apresentações clínicas observadas nestes pacientes, entretanto não há registros na literatura voltados à análise da influência destes medicamentos nos marcadores inflamatórios. Considerando isso, fizemos uma análise comparativa de todos os parâmetros entre os pacientes que estavam fazendo uso e dos que não estavam utilizando qualquer um dos dois medicamentos. Estes resultados não foram mostrados, mas não foi encontrada diferença significativa na concentração entre os grupos.

A análise laboratorial dos dados hematimétricos demonstrou maior proporção de células com o formato falciforme e conseqüentemente volume reduzido nos pacientes durante o estado de crise, representado através da queda no valor de VCM entre os pacientes em estado estacionário e em crise. O aumento dos leucócitos totais pareceu ser influenciado principalmente pelos níveis circulantes de neutrófilos e monócitos, onde ambos os tipos celulares já têm descrita sua participação no perfil inflamatório dos pacientes (20,66,67). Tal ideia é sustentada pela redução no nível destas células no estado convalescente, embora apenas os neutrófilos tenham sofrido uma queda significativa no período de três meses. Houve uma queda quantitativa dos monócitos circulantes, embora mesmo não significativa, torna à dúvida do tempo necessário para que estas células voltem ao estado basal de um paciente falciforme. Vale ressaltar que a produção de mediadores inflamatórios nos pacientes é diretamente proporcional à produção de moléculas e ativação das células do sistema imune.

Garcia et al. (67) destaca a importância e participação dos monócitos através da quantificação dos monócitos inflamatórios nos pacientes em EE, além da maior ativação do

TLR9 nestes pacientes. Vale ressaltar que o estudo de Garcia et al. (2020) também foi conduzido na mesma população que a nossa, porém não incluiu pacientes em crise vaso-oclusiva e convalescentes, o que remete à ideia de que a diferença observada nestes indivíduos pode ser mais evidente quando em pacientes durante a crise.

Embora outras células tenham apresentado diferença significativa quando comparado com o grupo controle, não iremos discutir neste trabalho, uma vez que o foco foi descrever e comparar o perfil de moléculas imunológicas entre os pacientes em estado estacionário e crise vaso-oclusiva, e avaliar a habilidade de 28 marcadores proteicos para caracterizar os perfis clínicos.

Os níveis séricos das quimiocinas foram representativos à participação principalmente dos monócitos e linfócitos T, assim como à migração quimiotática dos neutrófilos no perfil de CVO, através dos altos níveis circulantes de CCL3, CCL5 e CCL11. A indução da atividade destas células é marcante em pacientes falciformes em momentos de crise devido ao intenso grau de hemólise e consequente ativação das células da imunidade inata, o que leva a um processo inflamatório vicioso, corroborando com os níveis circulantes de leucócitos encontrados em nosso estudo, assim como a alta habilidade destas células, principalmente, na adesão ao endotélio e entre células, o que caracteriza um processo vaso-oclusivo (20).

Embora seja um perfil descrito como inflamatório, foram observadas quedas significativas de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ no grupo CVO quando comparado aos indivíduos do grupo EE, assim como os níveis de IL-17A e IL-10, de forma a caracterizar o perfil clínico de CVO baseados em níveis elevados de IL-1ra, IL-2, IL-7, IL-4 e IL-5, marcadores de proliferação celular e polarização de resposta anti-inflamatória (68,69). A relação dos níveis de IL-1ra, junto com a IL-6, já foi descrita como influente na liberação de NETs pelos neutrófilos durante a crise, sugerindo um possível marcador de agravamento clínico (70). Nós sugerimos que o aumento de moléculas anti-inflamatórias circulantes está relacionado ao perfil inflamatório presente nos pacientes em CVO, porém, os mediadores inflamatórios podem estar diminuídos no sangue periférico devido ao alto consumo nos sítios de inflamação.

Os níveis de IL-12 entre estes grupos de pacientes foram similares ao descrito por Carvalho et. al. (61), assim como de TNF- α e IL-1 β por Qari et. al. (71), entretanto, contrastaram quanto ao observado para CXCL8 e IL-10. Por ser um marcador inflamatório, acreditamos que isso ocorra devido ao estado crônico de inflamação que ocorre no paciente em estado estacionário, não sendo um bom marcador para quadros agudos de dor.

Acreditamos que a maior concentração de IL-10 se deu em resposta aos altos níveis de IL-1 β nos pacientes estacionários devido à ativação endotelial recorrente (7). Embora nossos

resultados tenham apresentado baixos níveis de IL-1 β para o grupo CVO, esta citocina já foi descrita como um importante marcador de inflamação aguda, assim como associada ao desenvolvimento de acidente cardiovascular cerebral (AVC) nestes pacientes (72).

A participação da IL-6 na fisiopatologia falciforme ainda é incerta, embora se saiba que é uma citocina pró-inflamatória (72). A diminuição na concentração sérica de IL-6 dos pacientes estacionários também foi destacada por outros autores, uma vez que a concentração de IL-6 era levemente maior no grupo de crise do que no grupo estacionário (73), embora nosso estudo não tenha encontrado diferença significativa. Carvalho et al. (61) sugeriu que os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α podem ser bons preditores do estado estacionário, em contravérsia aos nossos resultados para IL-6 e TNF- α .

Em relação aos fatores de crescimento, o grupo CVO apresentou concentrações significativamente maiores de VEGF, demonstrando maior permeabilidade vascular, observado no perfil das células imunes circulantes em consequência ao estímulo inflamatório. Além disso, a alta concentração de PDGF-BB também foi descrita por Hatzipantelis et al. (74), e reflete o processo de maturação extracelular devido à necessidade de células maduras no sangue periférico, e a angiogênese que ocorre nesse estado. Em conjunto, o G-CSF faz alusão à maturação dos granulócitos, demonstrando principalmente a participação de neutrófilos, que é marcante no estado vaso-oclusivo (20).

O perfil de anafilotoxinas produzidos demonstrou menores níveis de C4a nos pacientes em estado de crise, o que acreditamos ser decorrente das características de hemólise na CVO e a capacidade da hemoglobina livre de inibir a ligação da C1q aos seus principais ligantes. Roumenina et al. (75) descreveu a influência do heme livre na inibição da via clássica do complemento, o que justifica os resultados encontrados para a concentração de C4a. Seguindo este raciocínio, e considerando que a ativação da via comum é dependente da cascata da via alternativa, clássica ou das lectinas, é de se esperar que houvesse menores níveis circulantes de C5a, em resposta ao consumo de C1q pela alta concentração de hemoglobina na via clássica do complemento.

Embora a concentração de C3a não tenha apresentado diferença significativa entre os grupos de pacientes falciformes, já é sabido na literatura que a condição hemolítica estimula a clivagem espontânea de C3 em C3a e C3b, o que acreditamos ter sido potencializado no quadro de hemólise observado em indivíduos durante a crise (75).

A análise dos pacientes na fase de CVO e CV reflete um perfil intermediário entre o período de crise e estado estacionário. Foi encontrada uma redução na concentração de CXCL8, CCL4, IL-1ra e PDGF-BB após a crise, o que destaca sua participação na migração

das células imunes, proliferação celular pela medula e maturação extramedular (59,66,70,76,77). Entretanto, somente a IL-1ra e PDGF-BB apresentaram menores concentrações quando comparados os pacientes do grupo EE com CVO. Este fator sugere o potencial destas duas moléculas como um marcador de melhora clínica para os pacientes convalescentes de uma CVO (69,78).

Já foi observada redução nos níveis de CXCL8 em pacientes falciformes após a alta hospitalar (79), destacando menor efeito quimiotático nas células circulantes (80), e redução da capacidade de adesão célula-endotélio (81), embora haja descrição de altos níveis de CXCL8 em pacientes no estado estacionário (61).

A correlação observada nos pacientes falciformes nunca havia sido descrita para todos os grupos. Garcia et al. (67) identificou a correlação entre as moléculas para os grupos DS e EE, no entanto, este estudo é pioneiro na relação entre as moléculas. Pacientes do grupo EE apresentam pouca relação entre as moléculas, enquanto que os pacientes do grupo CVO demonstraram maior relação positiva moderada e forte entre as moléculas de perfil anti-inflamatório principalmente. A perda de várias correlações positivas entre as principais moléculas demonstra maior estabilidade do perfil inflamatório, e caracteriza o estado transicional de crise para estacionário dos pacientes falciformes. Vale ressaltar que a condição de convalescença não é bem descrita na literatura, e pouco comentada inclusive na clínica hospitalar. Assim, estes resultados vêm com a proposta de contribuir com o acompanhamento laboratorial dos pacientes falciformes após quadros de crises agudas de dor.

Para responder ao objetivo de identificar possíveis biomarcadores com base nos estados clínicos, fizemos a análise de alto produtores, onde foi possível identificar que grande parte dos pacientes em estado estacionário apresenta maior produção de mediadores inflamatórios, provavelmente devido ao baixo estímulo regulatório (quando comparados ao grupo de crise), e menor indução do sistema imune. Em contrapartida, como já citamos anteriormente, o estado de crise é caracterizado por mediadores anti-inflamatórios e de proliferação celular, provavelmente devido ao alto consumo de moléculas nos sítios inflamatórios, assim como maior produção dos mediadores regulatórios, visando evitar possíveis reações de exacerbação.

Poucos estudos foram realizados para compreender a fisiopatologia falciforme, entretanto, muito ainda é desconhecido. Embora seja uma doença conhecida desde 1910, o estado inflamatório local e sistêmico, assim como nas múltiplas apresentações clínicas ainda é um mistério. Nós reconhecemos as limitações deste estudo, o que torna à necessidade de realizar outros, avaliando parâmetros epidemiológicos, sociais, clínicos e outros parâmetros

laboratoriais para obter uma visão mais ampla dos mecanismos envolvidos no agravamento clínico, assim como um monitoramento dos pacientes nos momentos de entrada hospitalar, alta hospitalar e convalescença, além de análises mais robustas para identificar outros biomarcadores imunológicos de progressão clínica, e validar os descritos aqui.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que o estado estacionário é marcado pela baixa quantidade de células do sistema imunológico, assim como maior hematócrito, embora não tenha sido significativo. Além disso, os marcadores imunológicos demonstraram um perfil inflamatório devido à maior concentração de IL-1 β , IL-12p70, IFN- γ , CCL2, IL-17A e GM-CSF. Além disso, há o maior controle do perfil inflamatório, que pode ser identificado através das concentrações circulantes de IL-10 e IL-1ra.

Conforme o paciente passa para o estado agudo de crise vaso-oclusiva, são observadas maior participação de leucócitos, principalmente neutrófilos e monócitos, além de ser uma condição marcada por um perfil anti-inflamatório, mediado por IL-4 e IL-5, e de proliferação de células através das concentrações de IL-2, IL-7, PDGF-BB e G-CSF. Ainda, demonstra menor controle dos mediadores inflamatórios, e pode ser caracterizado pela concentração sérica de IL-1 β .

Já na fase intermediária entre o quadro de vaso-oclusão para o estado estacionário, tem-se a queda dos primeiros marcadores inflamatórios de CXCL8, CCL4, IL-1ra e PDGF-BB, assim como há o corpo começa a regular o perfil inflamatório.

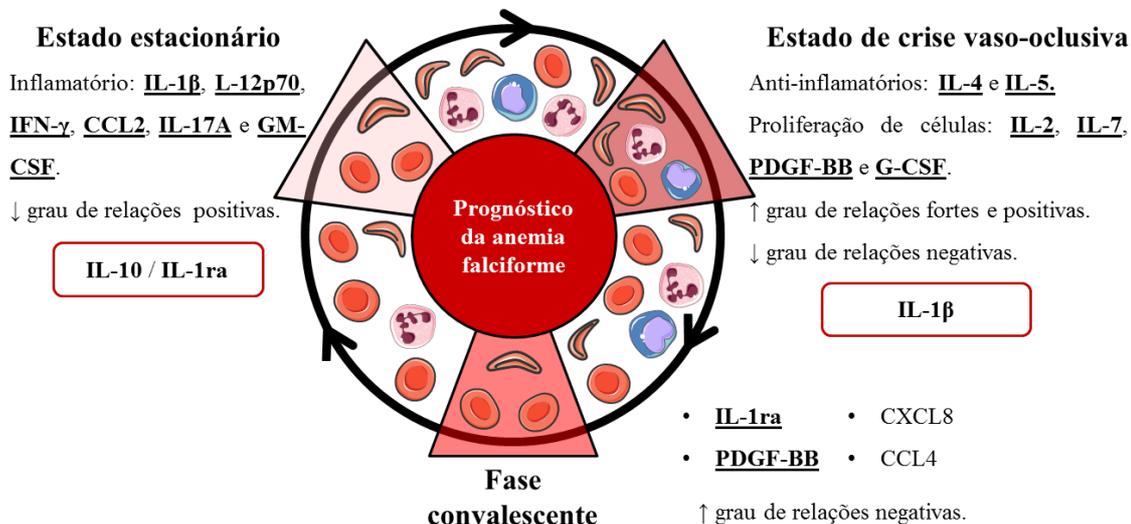


Figura 15: Conclusão.

Embora hajam poucos estudos voltados à pesquisa de biomarcadores para os pacientes com anemia falciforme, é notório que há uma demanda essencial na compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos no processo fisiopatológico da doença. Este estudo trouxe novas perspectivas frente ao estudo de biomarcadores imunológicos, mas entendemos nossas limitações quanto ao desenvolvimento do projeto, e sugerimos que estudos maiores

sejam conduzidos para que se possa conhecer melhor a interação entre os componentes do sistema imune e a gravidade apresentada pelos pacientes, além de comprovar a eficácia dos marcadores aqui descritos.

7. EQUIPE DO PROJETO

NOME	INSTITUIÇÃO	FORMAÇÃO ACADÊMICA	FUNÇÃO
Alexander Leonardo Silva Junior	UEA	Biomédico	Execução do projeto
Adriana Malheiro Alle Marie	HEMOAM	Bióloga, Dra.	Orientadora
Érich Vinicius de Paula	Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP	Médico Hematologista, Dr.	Coorientador
Allyson Guimarães da Costa	HEMOAM	Enfermeiro, Dr.	Auxílio na análise dos dados e quantificação das moléculas
Andrea Monteiro Tarragô	HEMOAM	Farmacêutica-Bioquímica, Dra.	Auxílio na análise dos dados
Andréa Teixeira de Carvalho	CPqRR	Farmacêutica-Bioquímica, Dra.	Auxílio na quantificação e análise das moléculas
Evilázio Cunha Cardoso	HEMOAM	Enfermeiro, MSc.	Auxílio nos procedimentos técnicos
Laurence Rodrigues Amaral	UFU	Cientista da Computação, Dr.	Auxílio na análise dos dados
Matheus Souza Gomes	UFU	Farmacêutico, Dr.	Auxílio na análise dos dados
Nadja Pinto Garcia	HEMOAM	Farmacêutica-Bioquímica, Dra.	Auxílio nos procedimentos técnicos, análise dos resultados
Nelson Abraham Fraiji	HEMOAM	Médico Hematologista, Dr.	Auxílio na análise dos dados
Olindo Assis Martins Filho	CPqRR	Farmacêutico-Bioquímico, Dr.	Auxílio na quantificação e análise das moléculas
Stephanny Dias Leite Mendonça	HEMOAM	Graduanda em Farmácia	Auxílio nos procedimentos técnicos

8. FINANCIAMENTO E INFRAESTRUTURA

Este projeto contou com o financiamento de outros projetos do grupo de pesquisa e recursos do laboratório Genômica-HEMOAM aprovado no âmbito do Programa Pró-estado da FAPEAM, CAPES-FAPEAM e CNPq. Além disso, contou também com auxílio financeiro do PROCAD para cumprimento dos processos metodológicos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sick cell disease. *Lancet*. 2010;376:2018–31.
2. Naoum PC. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2000;22(1):5–22.
3. Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM. Pathophysiology of Sick Cell Disease. 2018;(October):261–90.
4. Faes C, Sparkenbaugh EM, Pawlinski R. Hypercoagulable state in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018;68(2–3):301–18.
5. Vekilov PG. Sick cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? *Br J Haematol*. 2007;139(1):173–84.
6. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sick cell disease. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4:1–22.
7. Rees DC, Gibson JS. Biomarkers in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2011;156(1):433–45.
8. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sick Cell Disease. *N Engl J Med*. 2017;376(16):1561–73.
9. Herrick JB. Peculiar Elongated and Sick-shaped Red Blood Corpuscles in a Case of Severe Anemia. *Jama*. 1910;312(10):179–84.
10. Neel J V. The Clinical Detection of the Genetic Carriers of Inherited Disease. *Medicine (Baltimore)*. 1947;26(2):115–54.
11. Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC. Sick Cell Anemia, a Molecular Disease. *Science (80-)*. 1949;110(3):543–8.
12. Luzzatto L. Sick cell anaemia and malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1):1–6.
13. Allison AC. Protection Afforded by Sick-Cell Trait Against Subtertian Malarial Infection. *Br Med J*. 1954;1(1):290–4.
14. Saúde M da. Doença Falciforme: diretrizes básicas da linha de cuidado. 2015 p. 1–84.
15. Brasil. Portaria N° 822, de 06 de Junho de 2001. 2001 p. 1–19.
16. Lobo CL de C, Bueno LM, Moura P, Ogeda LL, Castilho S, Carvalho SMF de. Triagem neonatal para hemoglobinopatias no Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Panam Salud Publica*. 2003;13(2):154–9.
17. Brasil M da S. Doença Falciforme: Conhecer para Cuidar. 2015 p. 1–40.
18. Brasil M da S. Doença Falciforme: Condutas básicas para tratamento. 2012 p. 1–63.
19. Cesar P, Dhyani A, Schwade LA, Acordi P, Albuquerque CX, Nina R, et al. Epidemiological, clinical, and severity characterization of sickle cell disease in a population from the Brazilian Amazon. *Hematol Oncol Stem Cell Ther [Internet]*. 2019;12(4):204–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2019.04.002>
20. Zhang D, Xu C, Manwani D, Frenette PS. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood J*. 2016;127(7):801–10.
21. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 8. 2015.

- 1195 p.
22. Xu H, Wandersee NJ, Guo Y, Jones DW, Holzhauer SL, Hanson MS, et al. Sick cell disease increases high mobility group box 1: a novel mechanism of inflammation. *Blood*. 2014;124(26):3978–82.
 23. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim J-Y, Strassheim D, Ishizaka A, et al. Involvement of Toll-like Receptors 2 and 4 in Cellular Activation by High Mobility Group Box 1 Protein. *J Biol Chem* [Internet]. 2004;279(9):7370–7. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M306793200>
 24. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim J-Y, Strassheim D, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2006;290(3):917–24. Available from: <http://ajpcell.physiology.org/content/290/3/C917.abstract>
 25. Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock*. 2006;26(2):174–9.
 26. Cruvinel WDM, Júnior DM, Júlio Antonio Pereira Araújo, Catelan TTT, Souza AWS de, Silva NP da, et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*. 2010;50(4):434–61.
 27. Alam MZ, Devalaraja S, Haldar M. The Heme Connection: Linking Erythrocytes and Macrophage Biology. *Front Immunol*. 2017;8(33):6–11.
 28. Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash AI, et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood*. 2014;123(3):377–90.
 29. Lin S, Yin Q, Zhong Q, Lv F, Zhou Y, Li J, et al. Heme activates TLR4-mediated inflammatory injury via MyD88/TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2012;9(46):1–14. Available from: <http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/46>
 30. Omoti CE. Haematological Values in Sick Cell Anaemia in Steady State and During Vaso-Occlusive Crisis in Benin City, Nigeria. *Ann Afr Med*. 2005;4(2):62–7.
 31. Beers EJ Van, Yang Y, Raghavachari N, Tian X, Allen D, Nichols J, et al. Iron, Inflammation and Early Death with Sick Cell Disease. *Circ Res*. 2015;116(2):298–306.
 32. Chanrathammachart P, Mackman N, Sparkenbaugh E, Wang J-G, Parise L V., Kirchhofer D, et al. Tissue factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse model of sickle cell disease. *Blood*. 2012;120(3):636–47.
 33. Merle NS, Noe R, Halwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part II: role in immunity. *Front Immunol*. 2015;6(257):1–26.
 34. Merle NS, Boudhabhay I, Leon J, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement activation during intravascular hemolysis: Implication for sickle cell disease and hemolytic transfusion reaction. *Transfus Clin Biol* [Internet]. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2019.02.008>
 35. Merle NS, Paule R, Leon J, Daugan M, Robe-rybkine T, Poillerat V, et al. P-selectin drives complement attack on endothelium during intravascular hemolysis in TLR-4/heme-dependent manner. *PNAS*. 2019;116(13):6280–5.
 36. Murphy K. *Imunobiologia de Janeway*. Artmed Editora. 2014. 888 p.
 37. Merle NS, Grunenwald A, Rajaratnam H, Gnemmi V, Frimat M, Figueres M, et al. Intravascular hemolysis activates complement via cell-free heme and heme-loaded microvesicles. *JCI insight*. 2018;3(12):1–17.
 38. Wouters D, Zeerleder S. Complement inhibitors to treat IgM-mediated autoimmune hemolysis. *Hematologica*. 2015;100(11):1388–95.

39. Gavriilaki E, Mainou M, Christodoulou I, Koravou E-E, Paleta A, Touloumenidou T, et al. In vitro evidence of complement activation in patients with sickle cell disease. *Haematologica*. 2017;102(1):481–2.
40. Morigi M, Galbusera M, Gastoldi S, Buelli S, Pezzotta A, Pagani C, et al. Alternative Pathway Activation of Complement by Shiga Toxin Promotes Exuberant C3a Formation That Triggers Microvascular Thrombosis. *J Immunol*. 2011;187:172–80.
41. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2014;1843(11):2563–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
42. Gee K, Guzzo C, Mat NFC, Ma W, Kumar A. The IL-12 Family of Cytokines in Infection, Inflammation and Autoimmune Disorders. *Inflamm Allergy - Drug Targets*. 2009;8(1):40–52.
43. Smith AJP, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(1):43–59.
44. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2010;125(2):S53–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.008>
45. Hoffbrand A V., Moss PAH. *Fundamentos em Hematologia*. 6th ed. Porto Alegre; 2013.
46. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2000;68:1–8.
47. Young E, Lee Z, Song YW. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2009;8(5):379–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2008.12.002>
48. Jing H, Vassiliou E, Ganea D. Prostaglandin E2 inhibits production of the inflammatory chemokines CCL3 and CCL4 in dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2003;74(1):868–79.
49. Gupta PK, Prabhakar S, Sharma S, Anand A. Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and chemokine ligand-2 (CCL2) in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) patients. *J Neuroinflammation*. 2011;8(47):1–8.
50. Ren M, Guo Q, Guo L, Lenz M, Qian F, Koenen RR, et al. Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *EMBO J* [Internet]. 2010;29(23):3952–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.256>
51. Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol*. 2001;2(12):1126–32.
52. Finklestein SP, Apostolides PJ, Caday CG, Prosser J, Philips MF, Klagsbrun M. Increased basic fibroblast growth factor (bFGF) immunoreactivity at the site of focal brain wounds. *Brain Res*. 1988;460:253–9.
53. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent Synergism Between Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor in the Induction of Angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;189(2):824–31.
54. Xue Y, Lim S, Yang Y, Wang Z, Jensen LDE, Hedlund E-M, et al. PDGF-BB modulates hematopoiesis and tumor angiogenesis by inducing erythropoietin production in stromal cells. *Nat Med* [Internet]. 2011;18(1):100–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2575>
55. Hellberg C, Ostman A, Heldin CH. PDGF and Vessel Maturation. *Angiogenes Inhib*. 2010;1(1):103–14.

56. Sakiyama-elbert SE, Das R, Gelberman RH, Harwood F, Amiel D, Thomopoulos S. Controlled Release Kinetics and Biologic Activity of PDGF-BB for Use in Flexor Tendon Repairs. *J Hand Surg Am.* 2008;33(9):1548–57.
57. Croll SD, Ransohoff RM, Cai N, Zhang Q, Martin FJ, Wei T, et al. VEGF-mediated inflammation precedes angiogenesis in adult brain. *Exp Neurol.* 2004;187:388–402.
58. Ping Y, Yao X, Jiang J, Zhao L, Yu S, Jiang T, et al. The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 promote glioma stem cell-mediated VEGF production and tumour angiogenesis via PI3K/AKT signalling. *J Pathol.* 2011;224:344–54.
59. Keikhaei B, Mohseni AR, Norouzirad R, Alinejadi M, Ghanbari S, Shiravi F, et al. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. *Eur Cytokine Netw.* 2013;24(1):45–52.
60. Machado RF, Mack AK, Martyr S, MacArthur P, Sachdev V, Ernst I, et al. Severity of pulmonary hypertension during vaso-occlusive pain crisis and exercise in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2006;136(1):319–25.
61. Carvalho MOS, Araujo-Santos T, Reis JHO, Rocha LC, Cerqueira BA V., Luz NF, et al. Inflammatory mediators in sickle cell anaemia highlight the difference between steady state and crisis in paediatric patients. *Br J Haematol.* 2018;182(1):933–6.
62. Adisa OA, Hu Y, Ghosh S, Aryee D, Osunkwo I, Ofori-Acquah SF. Association between plasma free haem and incidence of vaso-occlusive episodes and acute chest syndrome in children with sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2013;162(5):702–5.
63. Pathare A, Al Kindi S, Alnaqdy AA, Daar S, Knox-Macaulay H, Dennison D. Cytokine Profile of Sickle Cell Disease in Oman. *Am J Hematol.* 2004;77(4):323–8.
64. Canalli AA, Conran N, Fattori A, Saad STO, Costa FF. Increased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease. *Exp Hematol.* 2004;32(1):728–34.
65. Taylor R. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. *J Diagnostic Med Sonogr.* 1990;6(1):35–9.
66. Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad STO, Costa FF. Effect of Cytokines and Chemokines on Sickle Neutrophil Adhesion to Fibronectin. *Acta Haematol.* 2005;113:130–6.
67. Garcia NP, Júnior ALS, Soares GAS, Costa TCC, Santos APC dos, Costa AG, et al. Sickle Cell Anemia Patients Display an Intricate Cellular and Serum Biomarker Network Highlighted by TCD4+CD69+ Lymphocytes, IL-17/MIP-1 β , IL-12/VEGF, and IL-10/IP-10 Axis. *J Immunol Res.* 2020;2020.
68. Musa BOP, Onyemelukwe GC, Hambolu JO, Mamman AI, Isa AH. Pattern of Serum Cytokine Expression and T-Cell Subsets in Sickle Cell Disease Patients in Vaso-Occlusive Crisis. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(4):602–8.
69. Zhang J-M, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesth Clin.* 2007;45(2):27–37.
70. Barbu EA, Mendelsohn L, Samsel L, Thein SL. Pro-inflammatory cytokines associate with NETosis during sickle cell vaso-occlusive crises. *Cytokine [Internet].* 2020;127(154933):1–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154933>
71. Qari MH, Dier U, Mousa SA. Biomarkers of Inflammation, Growth Factor, and Coagulation Activation in Patients With Sickle Cell Disease. *Clin Appl Thromb.* 2012;18(2):195–200.
72. Asare K, Gee BE, Stiles JK, Wilson NO, Driss A, Quarshie A, et al. Plasma interleukin-1 β concentration is associated with stroke in sickle cell disease. *Cytokine.* 2010;49(1):39–44.
73. Sarray S, Saleh LR, Saldanha FL, Al-habboubi HH, Mahdi N, Almawi WY. Cytokine Serum IL-6, IL-10, and TNF α levels in pediatric sickle cell disease patients during

- vasoocclusive crisis and steady state condition. *Cytokine* [Internet]. 2015;72(1):43–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.11.030>
74. Hatzipantelis ES, Pana ZD, Gombakis N, Taparkou A, Tzimouli V, Kleta D, et al. Endothelial activation and inflammation biomarkers in children and adolescents with sickle cell disease. *Int J Hematol*. 2013;98(2):158–63.
 75. Roumenina LT, Rayes J, Lacroix-Desmazes S, Dimitrov JD. Heme: Modulator of Plasma Systems in Hemolytic Diseases. *Trends Mol Med* [Internet]. 2016;22(3):200–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2016.01.004>
 76. Adegoke SA, Kuti BP, Omole KO, Smith OS, Oyelami OA, Oyewole O. Paediatrics and International Child Health Acute chest syndrome in sickle cell anaemia: higher serum levels of interleukin-8 and highly sensitive C-reactive proteins are associated with impaired lung function. *Paediatr Int Child Health* [Internet]. 2018;00(00):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1080/20469047.2018.1519988>
 77. Alagbe AE, Olaniyi JA, Aworanti OW. Adult Sickle Cell Anaemia Patients in Bone Pain Crisis have Elevated Pro-Inflammatoru Cytokines. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2018;10(2018017):1–9.
 78. Asare K, Gee BE, Stiles JK, Wilson NO, Driss A, Quarshie A, et al. Plasma interleukin-1 β concentration is associated with stroke in sickle cell disease. *Cytokine* [Internet]. 2010;49(1):39–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2009.10.002>
 79. Cajado CS, Cerqueira BA V, Barbosa CG, Lyra IM, Adorno E V, Gonçalves MS. IL-8 e TNF-ALFA: Marcadores Imunológicos da Anemia Falciforme. *Gaz Médica Bahia*. 2010;80(3):56–61.
 80. Hoppe CC. Inflammatory Mediators of Endothelial Injury in Sickle Cell Disease. *Hematol Clin N Am* [Internet]. 2014;28(2):265–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2013.11.006>
 81. Makis AC, Hatzimichael EC, Bourantas KL. The role of cytokines in sickle cell disease. *Ann Hematol*. 2000;79(1):407–13.
 82. Neto GC de G, Pitombeira M da S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *J Bras Patol e Med Lab*. 2003;39(1):51–6.
 83. Cavalcante JEA, Machado RPG, Laurentino MR, Santos TE de J dos, Bandeira ICJ, Filho PAM, et al. Clinical events and their relation to the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genotypes in Sickle-Cell- Anemia patients. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2016;9:14–9.
 84. Ibiapina HNS, Costa AG, Sachett JAG, Silva IM, Tarragô AM, Neves JCF, et al. An Immunological Stairway to Severe Tissue Complication Assembly in Bothrops atrox Snakebites. *Front Immunol*. 2019;10(1882):1–12.
 85. Pathare A, Kindi SAL, Daar S, Dennison D. Cytokines in Sickle Cell Disease. *Hematology*. 2003;8(5):329–37.
 86. Vilas-boas W, Cerqueira BAV, Figueiredo CVB, Santiago RP, Guarda CC da, Pitanga TN, et al. Association of homocysteine and inflammatory-related molecules in sickle cell anemia. *Hematology*. 2015;1–6.
 87. Silva RR da, Pereira MC, Rêgo MJB, Hatzlhofer BLD, Araújo A da S, Bezerra MAC, et al. Cytokine Evaluation of Th17 related cytokines associated with clinical and laboratorial parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine* [Internet]. 2014;65(2):143–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.11.012>
 88. Veiga PC, Schroth RJ, Guedes R, Freire SM, Nogueira-Filho G. Serum cytokine profile among Brazilian children of African descent with periodontal inflammation and sickle cell anaemia. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2013;58(5):505–10. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.11.006>
89. Villagra J, Shiva S, Hunter LA, Machado RF, Gladwin MT, Kato GJ. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood*. 2007;110(6):2166–73.
 90. Eklund CM. PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN CRP BASELINE REGULATION. *Adv i Clin Chem*. 2009;48(09):111–36.
 91. Damanhoury GA, Jarullah J, Marouf S, Hindawi SI, Mushtaq G, Kamal MA. Clinical biomarkers in sickle cell disease. *Saudi J Biol Sci [Internet]*. 2015;22(1):24–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.09.005>
 92. Hibbert JM, Hsu LL, Bhathena SAMJ, Irune I, Sarfo B, Creary MS, et al. Proinflammatory Cytokines and the Hypermetabolism of Children with Sickle Cell Disease. *Exp Biol Med*. 2004;230(1):68–74.
 93. Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad STO, 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;85:235–42.
 94. Pitanga TN, Oliveira RR, Zanette DL, Guarda CC, Santiago RP, Santana SS, et al. Sickle red cells as danger signals on proinflammatory gene expression, leukotriene B4 and interleukin-1 beta production in peripheral blood mononuclear cell. *Cytokine [Internet]*. 2016;83(1):75–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2016.03.016>
 95. Safaya S, Steinberg MH, Klings ES. Monocytes from sickle cell disease patients induce differential pulmonary endothelial gene expression via activation of NF- κ B signaling pathway. *Mol Immunol [Internet]*. 2012;50:117–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2011.12.012>

10. ANEXOS

10.1. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM)

10.1.1. Parecer do projeto “Potenciais Biomarcadores Celulares e Solúveis Associados a Diferentes Haplótipos e Fenótipos de Anemia Falciforme”

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Potenciais Biomarcadores Celulares e Solúveis Associados a Diferentes Haplótipos e Fenótipos de Anemia Falciforme.

Pesquisador: Nadja Pinto Garcia

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56413316.9.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.864.640

Apresentação do Projeto:

As doenças falciformes (DFs) são as desordens monogênicas mais prevalentes, responsáveis por alta mortalidade e morbidade com uma sobrevivência média estimada de 45 a 48 anos na sociedade ocidental, consistindo em um problema de saúde pública em várias nações (Van Beers et al., 2015).

Trata-se de um estudo observacional analítico transversal. Amostragem: Pacientes diagnosticados com anemia falciforme, tanto em crises vaso-oclusivas quanto em estado estacionário, atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-HEMOAM por

livre demanda, localizada na cidade de Manaus-AM. Os indivíduos enquadrados no grupo controle serão doadores de sangue, coletados ao acaso, sem doenças aparentes. Coleta de Dados e Material Biológico: A coleta de dados e amostra biológica será realizada na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHEMOAM, onde os indivíduos serão abordados e convidados a participar da pesquisa e assinar em

seguida o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE e posteriormente será aplicado um questionário estruturado, com itens como:

Número de identificação, nome do candidato amostrado, sexo, idade, local de nascimento e origem; dados sobre a sintomatologia da doença, tipos de infecções, uso de medicamentos,

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.864.640

número de transfusões.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar potenciais biomarcadores celulares e solúveis associados a diferentes haplótipos e fenótipos de pacientes com anemia falciforme.

Objetivo Secundário:

- Caracterizar o perfil fenotípico funcional de leucócitos circulantes envolvidos na resposta inflamatória na anemia falciforme;
- Dosar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e regulatórias circulantes em pacientes com anemia falciforme;
- Descrever os haplótipos dos pacientes com anemia falciforme e relacioná-los com os fenótipos clínicos e imunológicos.
- Determinar a frequência alélica dos polimorfismos do receptor NLRP3;
- Relacionar os perfis de citocinas com os polimorfismos do receptor NLRP3.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Durante a participação no projeto, os pacientes estarão sujeitos aos riscos inerentes a coleta de material biológico por função venosa durante as crises vaso-oclusivas e em estado estacionário; Poderão ter seus dados pessoais e de prontuários expostos aos pesquisadores do projeto, porém será mantido em sigilo a privacidade dos participantes da pesquisa durante todas as fases da pesquisa.

Benefícios:

O projeto consiste em pesquisa básica com intuito de determinar um biomarcador preditor de mudanças na intervenção clínica de pacientes com anemia falciforme. Com isso, pode proporcionar subsídios para pesquisas clínicas voltadas para diminuir a morbidade e assim melhorar a qualidade de vida dos portadores dessa hemoglobinopatia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa interessante e bem descrita que nos proporcionará maior conhecimento sobre a anemia falciforme.

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.864.640

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos solicitados foram anexados, vale apenas ressaltar a importância da identificação no TCLE como primeira e segunda via (participante e pesquisador).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_710211.pdf	21/09/2016 18:26:33		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCompleto.pdf	21/09/2016 18:26:12	Nadja Pinto Garcia	Aceito
Outros	Carta_resposta_Comite.pdf	21/09/2016 18:19:17	Nadja Pinto Garcia	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Evilasio.pdf	21/09/2016 17:55:11	Nadja Pinto Garcia	Aceito
Outros	Anuencia_Departamento_Atendimento_Paciente.pdf	21/09/2016 17:51:01	Nadja Pinto Garcia	Aceito
Outros	Anuencia_Departamento_AnalisesClinicas.pdf	21/09/2016 17:50:31	Nadja Pinto Garcia	Aceito
Outros	Anuencia_Departamento_Atendimento_Doador.pdf	21/09/2016 17:49:38	Nadja Pinto Garcia	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_GuardaChuva_Completo.pdf	21/09/2016 17:43:18	Nadja Pinto Garcia	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	20/05/2016 12:11:12	Nadja Pinto Garcia	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Triagem_Pacientes.pdf	11/05/2016 23:05:19	Nadja Pinto Garcia	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencias_Pesquisadores.pdf	11/05/2016 22:43:41	Nadja Pinto Garcia	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_Instituicao.pdf	11/05/2016 22:42:40	Nadja Pinto Garcia	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.864.640

Não

MANAUS, 13 de Dezembro de 2016

Assinado por:
Elisa Brosina de Leon
(Coordenador)

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

10.1.2. Parecer do projeto “Marcadores de Ativação da Inflamação da Doença Falciforme”

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Marcadores de ativação da inflamação na Doença Falciforme.

Pesquisador: Evilázio Cunha Cardoso

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 71147817.3.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.478.469

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa propõe determinar os níveis circulantes de DAMPs nas crises de agudização da Doença Falciforme, assim como sua correlação com a ativação de diferentes compartimentos da resposta imune inata.

A doença falciforme é uma hemoglobinopatia caracterizada por hemólise crônica e tendência a fenômenos vasocclusivos. Clinicamente ela se manifesta como uma doença inflamatória crônica com lesão orgânica progressiva, e episódios recorrentes de agudização. Dados recentes mostram que mediadores inflamatórios liberados pela hemólise e pela lesão tecidual, conhecidos como DAMPs (padrões moleculares associados ao perigo imunológico) exercem papel importante na ativação e perpetuação da resposta inflamatória. Entre os principais DAMPs destacam-se o heme e o HMGB1.

Uma das características mais importantes da doença falciforme é a propensão a fenômenos tromboembólicos. Neste projeto pretendemos avaliar os níveis de heme e HMGB1 durante as crises de agudização da doença falciforme, e correlaciona-los com marcadores de ativação inflamatória e da coagulação. A identificação do papel destes DAMPs na doença falciforme tem o potencial de abrir novos caminhos para o tratamento desta condição.

A hipótese dos pesquisadores é que os níveis dos DAMPs heme e HMGB1 estejam correlacionados com a ativação da coagulação e com o recrutamento de leucócitos na fase aguda da doença

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 2.478.469

falciforme.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

- Determinar os níveis circulantes de DAMPs nas crises de agudização da DF, assim como sua correlação com a ativação de diferentes compartimentos da resposta imune inata.

Objetivos específicos

- Determinar os níveis circulantes de HMGB1 e heme livre nas crises algicas e na STA em pacientes com DF;

- Determinar a associação entre os níveis de HMGB1 e heme com os seguintes marcadores de ativação da imunidade inata: Marcadores da ativação da coagulação (dosagem de dímeros D; expressão de RNAm de fator tecidual) e Contagem de neutrófilos e plaquetas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sobre os riscos, os pesquisadores relatam que " Será realizada uma assepsia em sua pele para evitar qualquer tipo de contaminação da amostra. Durante a coleta de você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas ou edema no local da picada. Para amenizar estes desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal bastante treinado. Cuidados locais serão tomados para a diminuição do desconforto, tais como compressão do local puncionado, manutenção do curativo por no mínimo 4 horas, como ocorre em qualquer coleta de sangue para exames. O corpo clínico estará a disposição para auxiliar caso ocorra algum dano maior."

Em relação aos Benefícios, descrevem que "O estudo da correlação dos níveis deste DAMPs com outros marcadores de ativação do sistema imune têm o potencial de gerar informações novas e relevantes sobre a fisiopatologia da doenças falciforme".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Será realizada uma pesquisa de abordagem quantitativa e caráter experimental e descritivo, cujo objetivo final é determinar os níveis circulantes de DAMPs nas crises de agudização da DF, assim como sua correlação com a ativação de diferentes compartimentos da resposta imune inata.

O pesquisador descreveu que o N amostral será composto por aproximadamente 36 pacientes com DF na vigência de crises de agudização do tipo algicas e STA (descrito apenas na PB). Além disso, serão coletadas amostras de indivíduos saudáveis (n=20, descrito no projeto suplementar anexo na PB).

O Estudo não é multicêntrico, não propõe dispensa do TCLE e haverá retenção de amostras para

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 2.478.469

armazenamento em biorrepósito (Fundação HEMOAM) por 5 anos (período de vigência do estudo). Os resultados gerados no respectivo estudo serão expressos como mediana, percentis, valores mínimos e máximos, além de média e desvio padrão. Para comparação entre grupos e experimentos, a distribuição das variáveis será testada, e os testes adequados selecionados (teste t ou Mann-Whitney). As comparações entre amostras pré e pós serão feitas com testes dependentes (teste t dependente ou Wilcoxon). Correlações serão avaliadas pelo teste de Pearson ou Spearman. Significância estatística será considerada quando $P < 0,05$. Para demonstração de uma diferença da ordem de 1 desvio-padrão entre os momentos pré e pós crise de agudização, foi calculado um tamanho amostral de 16 pacientes, com poder estatístico de 0.8.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. Folha de Rosto: Anexado na PB;
2. Carta de Anuência da Instituição: Adequado e presente na PB;
3. TCLE: Anexado na PB (Adequado);
4. Instrumento da pesquisa: Anexado na PB;
5. Riscos: Adequado;
6. Benefícios: Adequado;
7. Currículo Lattes: Link do pesquisador responsável na PB (Presente);
8. Critérios de Inclusão e Exclusão: Adequado;
9. Número de participantes a serem incluídos: Adequado;
10. Carta de Anuência dos Pesquisadores: Adequada e presente na PB.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto é executável e importante para determinar os níveis circulantes de DAMPs nas crises de agudização da Doença Falciforme. É viável do ponto de vista ético e está de acordo com a Res. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_960973.pdf	17/11/2017 20:28:30		Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 2.478.469

Outros	CL.pdf	17/11/2017 20:27:36	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	4.pdf	17/11/2017 20:26:30	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3.pdf	17/11/2017 20:26:16	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	2.pdf	17/11/2017 20:25:54	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	1.pdf	17/11/2017 20:25:14	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	17/11/2017 20:23:34	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	17/11/2017 20:23:12	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Outros	anuencia.pdf	12/07/2017 17:35:30	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA.pdf	12/07/2017 17:35:09	Evilázio Cunha Cardoso	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 30 de Janeiro de 2018

Assinado por:
Adriana Malheiro
(Coordenador)

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

10.2. Termos de Consentimento (TCLE) e Assentimento (TA) aplicados

10.2.1. TCLE do projeto “Potenciais Biomarcadores Celulares e Solúveis Associados a Diferentes Haplótipos e Fenótipos de Anemia Falciforme”

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Conforme Resolução N° 196/1996 do CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE

TÍTULO DO ESTUDO: Potenciais Biomarcadores Celulares e Solúveis associados a Diferentes Hapótipos e Fenótipos de Anemia Falciforme.

JUSTIFICATIVA/OBJETIVOS: Gerar informações sobre o perfil fenotípico funcional de leucócitos circulantes, citocinas e quimiocinas e polimorfismos do receptor NLRP3 para a determinação de um biomarcador preditor de mudanças na intervenção clínica de pacientes com anemia falciforme.

PROCEDIMENTOS: Para este estudo será coletada amostra de 12 mL de sangue. Serão feitos testes para verificar o perfil de células sanguíneas, citocinas, quimiocinas e genotipagem. Todos esses testes serão realizados na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM em Manaus.

RISCOS E DESCONFORTOS: Não existem riscos associados à participação deste estudo. O único desconforto é o da picada da agulha.

BENEFÍCIOS: A participação neste estudo não traz nenhum benefício direto e imediato para o senhor (a), mas poderá contribuir para mudanças positivas na intervenção clínica de pacientes com anemia falciforme.

ACOMPANHAMENTO ASSISTENCIAL: O senhor (a) terá, sempre que necessário, orientação, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial pela equipe médica da FHEMOAM, no que diz respeito à anemia falciforme, podendo entrar em contato com a doutoranda Nadja Garcia (HEMOAM:3655-0231/Tel: 92-98127-1539). Também serão feitos pela equipe médica do HEMOAM os encaminhamentos necessários de acordo com o local onde o doador residir.

VOLUNTARIEDADE: A sua participação neste estudo é voluntária, podendo ser retirada a qualquer momento, sem que isso atrapalhe o seu atendimento no HEMOAM.

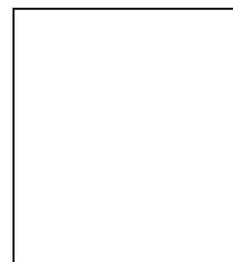
CONFIDENCIALIDADE, PRIVACIDADE E ANONIMATO: Os seus dados pessoais referentes à participação neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar a sua identidade.

USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO: O material biológico coletado (sangue) será utilizado somente para o que se propõe neste estudo e solicitamos a sua autorização para armazenamento de material para estudos posteriores. Garantimos que toda nova pesquisa a ser realizada utilizando as amostras armazenadas será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da FHEMOAM e, se for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

O Sr. (a) autoriza que o seu sangue seja guardado para futuras pesquisas imunogenéticas na anemia falciforme? () Sim ou () Não

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.



(Assinatura do participante)

(Impressão dactiloscópica)

(Assinatura do pesquisador)

Manaus, ____/____/____.

10.2.2. TCLE do projeto “Marcadores de Ativação da Inflamação da Doença Falciforme”

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Marcadores da ativação da inflamação na doença falciforme

Prof °. Dr Nelson Fraiji/Prof °. Dr Erich Vinicius de Paula/Evilázio Cunha Cardoso

NÚMERO DO CAAE: 71147817.3.0000.0009

Você está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) dessa pesquisa sobre a doença falciforme. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tem por objetivo garantir seu direito como participante é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador. Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com os pesquisadores. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou se quiser retirar sua autorização a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA:

A doença falciforme (ou anemia falciforme) é causada por uma alteração genética nos glóbulos vermelhos do sangue, que altera a forma como estas células circulam no sangue dos pacientes. Devido a esta alteração, os glóbulos vermelhos se ligam mais fortemente aos vasos e a outras células do sangue, podendo causar obstruções na circulação que levam a crises de dor, falta de ar, e redução da função de alguns órgãos. Durante estas crises, várias substâncias são liberadas no sangue, que podem piorar o quadro de dor ou de falta de ar. A identificação destas substâncias, que chamamos de “marcadores de ativação da inflamação” é importante para que novos tratamentos possam ser desenvolvidos. Esta pesquisa tem por objetivo identificar novos marcadores de ativação da inflamação e compreender o papel de cada um deles na doença falciforme. Algumas pessoas sem a doença falciforme também serão convidadas a participar, pois seus resultados são importantes para comparação com os pacientes (o chamado grupo controle).

PROCEDIMENTOS:

Uma amostra de sangue totalizando 23 ml (o equivalente a cerca de 6 colheres de sopa) será coletada de sua veia em até 48 horas de sua chegada ao HEMOAM para tratamento de qualquer crise da doença falciforme. Além disso, alguns dados de seu prontuário serão obtidos pelos pesquisadores. Após sua melhora, uma nova amostra de sangue será coletada para comparação dos resultados. As coletas de sangue serão realizadas no mesmo momento (mesma picada) da coleta dos exames para seu tratamento. A coleta após sua melhora será realizada antes de sua alta, ou na primeira vez que você voltar ao ambulatório.

DESCONFORTOS E RISCOS:

Durante a coleta de você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da picada. Para amenizar estes desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal bastante treinado. Cuidados locais serão tomados para a diminuição do desconforto, tais como compressão do local puncionado, manutenção do curativo por no mínimo 4 horas, como ocorre em qualquer coleta de sangue para exames.

BENEFÍCIOS:

Não há benefícios diretos na participação neste estudo. Indiretamente, você estará contribuindo para um melhor entendimento sobre esta doença.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:

Após sua participação nesta pesquisa, você continuará seu tratamento em sua instituição, mesmo após o encerramento da pesquisa. Os resultados dos exames realizados neste tubo não incluem exames utilizados para o seu tratamento, e serão usados apenas na análise desta pesquisa.

SIGILO E PRIVACIDADE:

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos.

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO:

Não haverá ressarcimento de despesas de transporte, alimentação, diárias, já que o estudo será feito durante um atendimento médico. Caso você tenha que comparecer a sua instituição apenas devido a este estudo, você será ressarcido com os custos de transporte (ônibus) e alimentação. Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

ACONSELHAMENTO GENÉTICO:

Os dados desta pesquisa não se relacionam a aconselhamento genético. No entanto, os pesquisadores estarão disponíveis para discutir quaisquer dúvidas sobre a doença falciforme com você.

ARMAZENAMENTO DE MATERIAL:

O material colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda com o armazenamento deste material. Caso seja realizado outro estudo com este material, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda ou não com a participação em outro estudo, que só será realizado após nova autorização do Comitê de Ética em pesquisa desta instituição.

- () Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.
- () Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____.

(O participante deve indicar o nome de uma pessoa a ser contatada).

CONTATO:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores listados abaixo:

Dr. Nelson Fraiji, - Hemoam - Contato: (92) 36550224

Dr. Erich Vinicius de Paula – Hemocentro da UNICAMP - Contato: (19) 35218627

Evilazio Cunha Cardoso – HEMOAM – (92) 991836887

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

- Comitê de Ética em Pesquisa do HEMOAM: Av. Constantino Nery, 3240 – Chapada - CEP 69050-001, Manaus – AM; telefone (92) 3655-0014

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP).

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas.

OUTRAS INFORMAÇÕES:

1. O voluntário estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
2. O voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver, ou que aparecerem durante o estudo, sobre o mesmo, havendo o compromisso do pesquisador em respondê-las.
3. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica.
4. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em outro tratamento ou procedimento que possa necessitar em qualquer serviço de nosso hospital.

5. Caso você se sinta prejudicado ou de alguma forma lesionado, você tem o direito de procurar obter indenização por danos eventuais.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante: _____

Contato telefônico: _____ e-mail (opcional): _____

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)

10.2.3. TA do projeto “Marcadores de Ativação da Inflamação da Doença Falciforme”

Termo de Assentimento

Título do projeto: Marcadores de Ativação da Inflamação na Doenças Falciforme.

Coordenação da Pesquisa: Orientador prof. Dr. Nelson Abriam Fraiji e Co-orientador prof. Dr. Erich Vinícius de Paula e pesquisador: Evilázio Cunha Cardoso.

A pesquisa de será realizada com os pacientes com 10 ou mais anos de idade completo com diagnóstico de Anemia Falciforme, admitido na Unidade de Urgência da Fundação HEMOAM, com diagnóstico clínico de crise álgica grave e/ou síndrome torácica aguda O principal objetivo do estudo é determinar os níveis circulante de padrão molecular associada a danos (DAMPs) nas crise de agudização da Doença Falciforme, assim como sua correlação com a ativação de diferentes compartimentos da resposta imune inata. A importância da identificação dos marcadores (DAMPs), tem o potencial de abrir novos caminhos para o tratamento de paciente com anemia falciforme.

As amostras serão realizadas durante as coletas de outras amostras de rotinas da instituição e antes de procedimentos de transfusão, será feita através de punção venosa periférica ou cateter venoso central, além disso será realizada uma coleta adicional após a convalescência, isto é, pré-alta do paciente. A quantidade da amostra de sangue será no total de 23(vinte e três) ml para os pacientes adultos e adolescente com peso acima de 35 kg, e 15 (quinze) ml para criança de peso igual ou menor de 35kg.

As informações contidas neste Termo de Assentimento estão de acordo com as normas éticas destinadas à pesquisa envolvendo seres humanos da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde. Em caso de dúvidas, entrar em contato com o pesquisador responsável na sua cidade ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP):

Nome do pesquisador responsável: Evilázio Cunha Cardoso

Local: Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM

Telefone: (92) 99183-6887/ 36550218

Todas as informações que serão obtidas são confidenciais, e serão armazenadas em um computador, ou seja, o seu nome não aparecerá em nenhuma publicação

apresentação ou documento. Deste modo você tem a garantia que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos

Não há despesas pessoais para o participante. Também não haverá compensação financeira relacionada à participação. Os dados coletados nesta pesquisa serão utilizados especificamente para este estudo e para artigos relacionados à própria pesquisa, não podendo ser utilizados para nenhuma outra pesquisa de outra ordem sem seu consentimento.

garantida a liberdade de não querer participar da pesquisa, parcialmente ou integralmente. A recusa não causará nenhum prejuízo na relação com os pesquisadores, e/ou instituição.

Para o participante:

Você entendeu e se sente perfeitamente esclarecido(a) quanto aos objetivos da pesquisa?

Sim Não

Você entendeu e se sente perfeitamente esclarecido(a) quanto a como será sua participação na pesquisa?

Sim Não

Você concorda em participar da pesquisa? Sim Não

Confirmo ter recebido via assinada deste Termo de Assentimento.

Manaus/AM, ____ de _____ de 2017

Nome do **participante:** _____

Assinatura do(a) **Responsável:** _____

10.3. Questionários aplicados aos pacientes com Anemia Falciforme

10.3.1. Questionário do projeto “Potenciais Biomarcadores Celulares e Solúveis Associados a Diferentes Haplótipos e Fenótipos de Anemia Falciforme”



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA



FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS - FHEMOAM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS A HEMATOLOGIA

Nº Registro: _____

Data: ____/____/____

QUESTIONÁRIO E FICHA DE CADASTRO INDIVIDUAL:

Projeto: “Potenciais Biomarcadores Celulares e Solúveis associados a Diferentes Haplótipos e Fenótipos de Anemia Falciforme”

Nome: _____

Sexo: (M) (F) Data de Nascimento: _____ Idade: _____ anos

Local de Nascimento: _____ UF: _____

Cor de Pele: Branco () Moreno () Negro () Escolaridade: _____

Trabalha: _____ Profissão: _____

Estado Civil: Solteiro () Amigado () Casado () Divorciado () Separado () Viúvo () a quanto tempo () Possuem Filhos: Sim () Não () Quantos: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Município: _____ UF: _____ Tipo de Moradia: _____

	Outras doenças infecciosas?		
	() Sim () Não	Outras Drogas	
	Qual (ais)?	Sim () Não ()	
	_____	Tipo_____	
	_____	Quant. Temp.	
	_____	_____	

Sintomatologia

Febre () Sim () Não

Dor de Cabeça () Sim () Não

Dor nas articulações () Sim () Não

Fraqueza: () Sim () Não

Sudorese: () Sim () Não

Icterícia: () Sim () Não

Úlceras da Perna: () Sim () Não

Infecção de pele e nas úlceras: () Sim () Não

Crise Vaso-Oclusiva:

Já teve? () Sim () Não

Quantas? _____

Qdo foi a última? _____

Síndrome Torácica Aguda:

Já teve? () Sim () Não

Hipertensão Pulmonar:

Já teve? () Sim () Não

Sequestro Esplênico:

Já teve? () Sim () Não

Colelitíase:

Já teve? () Sim () Não

Osteonecrose de cabeça de fêmur:

Já teve? () Sim () Não

Priapismo:

Já teve? () Sim () Não

Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) () Positivo () Negativo

Identificação de Anticorpos Irregulares (IAI)

- Anti-D Anti-C Anti-c Anti-E Anti-e
 Anti-C^w Anti-G Anti-K Anti-Jk^a Anti-Jk^b
 Anti-Fy^a Anti-Fy^b Anti-P₁ Anti-Le^a Anti-Le^b
 Anti-M Anti-N Anti-S Anti-s Anti-Di^a
 Outros

Fenotipagem eritrocitária Rh e K

- C c (pequeno) E e (pequeno) K

10.4. Produção científica advinda dos resultados deste projeto

10.4.1. Manuscrito submetido e aprovado na revista *Frontiers in Immunology*.

Cover Letter

Manaus, AM, Brazil, May 6th 2020

Editor

Frontiers in Immunology

Dear Editor:

Sickle Cell Anemia (SCA) is the most common genetic disorder around the world. The physiopathology process is driven by chronic immunological parameters, with acute complication characterized by vaso-occlusion and consequently tissue injury, ischemia, reperfusion, stroke and increased risk of death. This immunological involvement is determined by soluble molecule profile, which has been correlated to worse their clinical presentation.

The knowledge of molecule profile in SCA patients is still controversial, and identification of hallmarks contribute to SCA patient follow-up, laboratorial and clinical control, besides reduction of vaso-occlusion crisis (VOC) risk and low death rates under this population.

Here we present the manuscript entitled "***Immunological Hallmarks for Inflammatory Status in Vaso-Occlusive Crisis of Sickle Cell Anemia Patients***" by Silva-Junior et al., submitted to *Frontiers in Immunology* for possible publication.

In this study, SCA patients were evaluated at the main hospital for hematological diseases in Brazilian Amazon. The evaluation was composed by three clinical moments: Steady State (StSt), which they present a no-threatening clinical symptoms and chronic inflammatory profile; Vaso-Occlusion Crisis (VOC), with acute

episode characterized by exacerbation of pro-inflammatory markers; and Convalescence (CV), 30-90 days after hospital attendance to a VOC and clinical recovery. Prospective study involved 27 patients in StSt and 22 patients in VOC, all included as hospital's regular patients; besides 53 Healthy Donors (HD) as control group. One sample was collected to HD and StSt groups, while two sample collections were made to VOC group. The second sample collection is described as the CV group. 28 immunological parameters were evaluated from all individuals enrolled and analyzed to describe their potentiality as hallmarks of clinical patient's status.

Our results demonstrate that VOC show unique immunological profile, with hallmarks description of clinical conditions, and ability to cluster SCA patient's. The results presented in our study contribute to patient's laboratorial follow-up and clinical monitoring at and after VOC. These data support not just a better understanding of disease, but also describe novel inflammatory markers.

We declare that the proposed manuscript describes original research and is not published or under consideration by another scientific journal. The data/results of the manuscript are not also plagiarized. We declare acknowledgment that the manuscript, after submission, may not have the order or the number of authors altered without providing any justification and/or information to this journal. Finally, we declare that if the manuscript is accepted for publication, all copyrights will transfer to Frontiers in Immunology.

As this topic, probably is of interest of Frontiers in Immunology, we hope this manuscript will be considered for publication. We look forward to hearing your opinion on this matter.

Best regards,

Allyson Guimarães da Costa (on behalf of all authors)

Immunological Hallmarks of Inflammatory Status in Vaso-Occlusive Crisis of Sickle Cell Anemia Patients

Alexander Leonardo Silva-Junior¹, Nadja P. Garcia², Evilázio C. Cardoso², Stephanny Dias², Andrea M. Tarragô², Nelson A. Fraiji², Matheus S. Gomes³, Laurence R. Amaral³, Andréa Teixeira-Carvalho⁴, Olindo A. Martins-Filho⁴, Erich V. De Paula⁵, Allyson G. Costa², Adriana Malheiro^{6*}

1. University of the State of Amazonas, Brazil;
2. Department of Education and Research, Hospital Foundation of Hematology and Haemotherapy of Amazonas, Brazil,
3. Federal University of Uberlândia, Brazil,
4. René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Brazil,
5. State University of Campinas, Brazil,
6. Federal University of Amazonas, Brazil.

***Correspondence:** Adriana Malheiro, malheiroadriana@yahoo.com.br

ABSTRACT

Sickle Cell Anemia (SCA) is the most common genetic disorder around the world. The mutation in the β -globin gene is responsible for a higher hemolysis rate, with further involvement of immunological molecules, especially cytokines, chemokines, growth factors and anaphylatoxins. These molecules are responsible for inducing and attracting immune cells into circulation, thus contributing to increases in leukocytes and other pro-inflammatory mediators, and can culminate in a vaso-occlusive crisis (VOC). This study aimed to characterize the levels of these molecules in SCA patients in different clinical conditions in order to identify potential hallmarks of inflammation in these patients. An analytical prospective study was conducted using the serum of SCA patients in steady-state (StSt; n=27) and VOC (n=22), along with 53 healthy donors (HD). Samples from the VOC group were obtained on admission and on discharge, in the convalescent phase (CV). Levels of chemokines (CXCL8, CXCL10, CL2, CLL3, CCL4, CL5 and CCL11), cytokines (IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, TNF- α , and IFN- γ) and growth factors (VEGF, FGFb, PDGF-BB, GM-CSF and G-CSF) were measured using a Luminex assay, and anaphylatoxins (C3a, C4a and C5a) were measured using Cytometric Bead Array. SCA patients in StSt showed a pro-inflammatory profile, and were indicated as being higher producers of CCL2, IL-1 β , IL-12p70, IFN- γ , IL-17A and GM-CSF, while VOC is highlighted by molecules IL-4 and IL-5, but also IL-2, IL-7, PDGF-BB and G-CSF. PDGF-BB and IL-1ra seemed to be two important hallmarks for the acute-to-chronic stage, due to their significant decrease after crisis inflammation and statistical difference in VOC and CV groups. These molecules show higher levels and a strong correlation with other molecules in VOC. Furthermore, they remain at higher levels even after crisis recovery, which suggest their importance in the role of inflammation during crisis and participation in

immune cell adhesion and activation. These results support a relevant role of cytokines, neutrophil and monocytes, since these may act as markers of VOC inflammation in SCA patients.

Keywords: Molecules; Hemolytic anemia; Brazilian Amazon; Immune profile; Inflammation; Biomarkers.

INTRODUCTION

Sickle cell anemia (SCA) is the most prevalent hemoglobinopathy around the world and the most severe form of a set of genetic disorders that involve the β -globin gene (1,2). It is caused by the homozygous form of a single mutation (adenine > thymine) on 17th nucleotide from region 15.5 of the long arm of chromosome 11, and results in production of a valine (instead of glutamic acid) and formation of a tetrameric protein known as hemoglobin S (HbS) (1,3–7).

The mutation induces major alterations in the structure of red blood cells (RBC) secondary to the polymerization of HbS in areas of low oxygen tensions (8). These alterations lead to changes in the interaction of RBC with platelets, leukocytes and endothelial cells, contribute to both vaso-occlusion of small capillaries, and ischemia-reperfusion injury, and result in chronic hemolysis (1,3). Accordingly, SCA is considered a chronic sterile inflammatory disease that occurs through ischemic injuries that contribute to the inflammatory process through the release of free hemoglobin during RBC hemolysis, besides other damage-associated molecular pattern (DAMP), such as heme and HMGB1. This leads to a stimulus of TLR4 and further promotes a chronic and sterile inflammation, adhesion of immune cells and vaso-occlusion process. The cellular response to this chronic stimulus contributes to the activation of neutrophils, monocytes, mast cells, endothelial cells, dendritic cells

and NK cells, which are all regulated by levels of inflammatory mediator's that are driven mainly by immunological molecules (1,8–14).

Although caused by a single mutation, the clinical presentation of SCA is modulated by the manner in which the immune system responds to chronic hemolysis and ischemia-reperfusion injury. Moreover, the disease is characterized by chronic progressive organ damage during periods known as steady-state (StSt), intercalated with acute episodes of vaso-occlusion, termed VOC, which are considered exacerbations of the pro-inflammatory condition of SCA with further formation of aggregates with immune cells, sickle RBCs and platelets (1,8–10).

The aggregate rate is related to increase in the risk of VOC, and consequences of this include tissue injury, hypoxia, ischemia-reperfusion, renal dysfunction, acute chest syndrome, stroke and finally, a decrease on the patient's life expectancy (3,8,10,11,15,16). Even though many studies have analyzed immunological patterns in SCA (17–21), the relationship between these molecules and VOC inflammatory status and clinical presentation, there are still some knowledge gaps.

This study aimed to evaluate whether and to what point cytokines, chemokines, anaphylatoxins and growth factors are hallmarks of inflammatory status for SCA patients in different clinical conditions treated at a hematological reference hospital in the Brazilian Amazon. We show here that even after clinical recovery from VOC, SCA patients still presented a higher concentration of pro-inflammatory mediators.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

The present study was submitted to and approved by the Ethical Committee at Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM), via the processes #1.864.640 and #2.478.469. All participants enrolled in the present investigation read and signed the informed consent form in accordance with the Declaration of Helsinki and Resolution 466/2012 of the Brazilian National Health Council for research involving human subjects.

Subjects and Samples

Whole blood samples were collected through venipuncture from 53 healthy donors (HD) that were eligible for blood donation and had no infectious or genetic disease. Samples were also collected from 27 patients with SCA in steady-state (StSt) condition (defined as the absence of clinical symptoms associated with VOC), who had not received a blood transfusion in the 90 days prior to recruitment, and had negative serology tests for HIV, HCV, HBV, HTLV and Syphilis. In addition, samples were also obtained from 22 patients with SCA in VOC (characterized by acute pain located at lumbar, hip, bone, articulation or abdominal with no other cause), which had been confirmed by health professionals at HEMOAM; the reference hospital in the Amazonas state for treatment of patients with hematological diseases. An additional blood sample was obtained from patients in the VOC group, in the period between the patients' discharge and their first outpatient visit, within 90 days from enrollment. These samples were identified as the convalescence (CV) group. Clinical and epidemiological data was obtained from medical records. In regards to treatment, the following medications were recorded: folic acid, hydroxyurea, analgesics, corticoids and anti-inflammatory drugs for more than 1 year prior to sample collection.

From all healthy donors and patients, 8 ml of whole blood was collected and divided equally into EDTA (BD Vacutainer[®] EDTA K2) tubes and Gel separator (Gel BD SST[®] II Advance) tubes. Whole blood in EDTA tubes was used for acquisition of hematological data for red blood cells (RBCs), white blood cells (WBCs) and platelets, which were obtained using an automatic hematological counter (ADVIA 2120i, Siemens, USA) at HEMOAM. Using centrifugation, serum was obtained from the tubes with separator gel and was then stored at -80°C until further assays.

Quantification of immunological molecules

Serum was used for quantifying chemokines (CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 and CCL11), cytokines (IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IFN- γ and TNF- α) and growth factors (G-CSF, GM-CSF, PDGF-BB, VEGF and FGF Basic [FGFb]), and was performed using the Luminex technique at Instituto René Rachou (FIOCRUZ-MG). The Bioplex-Pro Human Cytokine 27-Plex Kit (Bio-Rad, California, USA) was used following the manufacturer's instructions and protocol. Data acquisition and molecule levels were measured on a Luminex 200 System and Bioplex Manager Software, respectively, using the *Five Parameters Logistic Regression*, with results expressed in pg/ml. The detection limit of molecules is as follows: CXCL8 = 42.150 pg/ml; CXCL10 = 31.236 pg/ml; CCL2 = 24.282 pg/ml; CCL3 = 960 pg/ml; CCL4 = 11.233 pg/ml; PDGF-BB = 24.721 pg/ml, CCL5 = 16.533 pg/ml; CCL11 = 26.842; IL-1 β = 8.608 pg/ml; IL-1ra = 91.661 pg/ml; IL-2 = 18.297 pg/ml; IL-4 = 4.789 pg/ml; IL-5 = 23.105 pg/ml; IL-6 = 37.680 pg/ml; IL-7 = 16.593 pg/ml; IL-10 = 35.170 pg/ml; IL-12p70 = 37.684 pg/ml; IL-13 = 8.090 pg/ml; IL-17A = 28.850 pg/ml; IFN- γ = 25.411 pg/ml; TNF- α = 64.803 pg/ml; FGFb = 16.046 pg/ml; G-CSF = 40.049 pg/ml; GM-CSF = 12.844 pg/ml; and VEGF = 29.464 pg/ml. Due to bead analysis issues, IL-9 and IL-15 levels could not

be performed. In addition, quantification of anaphylatoxins C3a, C4a and C5a were performed using EDTA plasma samples with the BD™ CBA (Cytometric Bead Array) Human Anaphylatoxin kit (BD® Biosciences, San Diego, CA, USA). A FACSCanto II flow cytometer was used for sample acquisition. The analysis of the concentration of anaphylatoxin molecules was conducted using FCAP-Array software v.3 (Soft Flow Inc., USA). The detection limits are as follows: C3a = 0.45 pg/ml; C4a = 0.70 pg/ml; C5a = 1.15 pg/ml.

Statistical Analysis

Data analysis and graphs were performed using GraphPad Prism v.5.0 software (San Diego, CA, USA). The Shapiro-Wilk normality test was conducted for analysis of normality distribution and acquisition of median and (25th and 75th). The epidemiological data was compared for the groups using the Chi-square test (χ^2). The median of hematological parameters and molecule levels was used for comparison of HD, StSt and VOC using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's Multiple Comparison Test. For VOC and CV group comparison, the Wilcoxon matched pair test was used. A p value of < 0.05 was considered significant for all statistical tests.

Signature of Immunological molecules

The median of each molecule for HD, StSt and VOC groups was calculated, as previously described (22), and used as the cut-off point. This was expressed in pg/ml (CXCL8 = 2.64; PDGF-BB = 292.0; CCL3 = 0.96; CCL4 = 10.74; CCL2 = 9.07; CCL5 = 57.0; IL-1 β = 1.12; IL-1ra = 29.11; TNF- α = 12.12; IL-6 = 1.12; IL-7 = 2.82; IL-12p70 = 2.40; IL-2 = 0.44; IFN- γ = 15.85; IL-4 = 0.53; IL-5 = 2.93; IL-13 = 0.70; IL-17A = 6.74; IL-10 = 5.20; CXCL10 = 69.68; VEGF = 9.08; GM-CSF = 7.81; G-CSF = 1.24; FGFb = 3.64; CCL11 = 23.14; C3a = 10.03; C4a = 7.61; C5a = 316.9). This

value was employed to classify the patients for each group as being either “High” or “Low” molecule producers. The percentage value was obtained, and presented in a Venn diagram when higher than the 50th percentile, and obtained using a public website (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Immunological Hallmarks Network

The correlation analysis was conducted using Spearman test in GraphPad Prism v.5.0 software (San Diego, CA, USA), and employed all molecules and blood cell parameters for each group. The data was transferred to a spreadsheet (Microsoft Excel 2010), and the cytokine network was visualized on the open access software Cytoscape v.3.7.2. For all networks, each parameter was represented by a circular node, while a significant correlation was represented by a line connecting both correlated nodes. Absolute values of the correlation index (r) was used in order to classify correlation strength as weak ($r < 0$), moderate ($r \geq 0.36$ and ≤ 0.68), or strong ($r > 0.68$), which is represented by line thickness, while positive and negative correlation was represented by continuous and dashed lines, respectively, as previously proposed (23).

Heatmap and Decision tree analysis

The heatmap analyses were performed using the serum concentration levels of each biomarker evaluated using heatmap.2 function in R software (Project for Statistical Computing Version 3.0.1) and the gplots package. The decision trees were built using the WEKA software (Waikato Environment for Knowledge Analysis, version 3.6.11, University of Waikato, New Zealand) in order to classify SCA patients based on immunological markers. Leave-one-out-cross-validation (LOOCV) was

applied in order to estimate the classification accuracy and to test the generalizability of the model.

RESULTS

Epidemiological and laboratorial data

SCA patients presented a median of 22 years of age in StSt and VOC groups, while the median age of the control group was 30 years ($p = 0.0324$). Males were the majority gender in the HD group (70%), while females were the majority in the StSt group (67%). Data regarding place of residence and chronic pharmacological treatment is described in Table 1.

Hematological values of each group, the medians and the results of the statistical analysis are described in Table 2. Patients in StSt had lower RBC, hemoglobin and hematocrit levels, when compared to the healthy donors. In addition, SCA patients (both StSt and VOC) showed increased levels of reticulocytes. The VOC group was marked by higher WBC counts, which seem to be driven by neutrophil and monocyte involvement, although only the neutrophil level was statistically lower after crisis. Basophil levels decreased in conditions of StSt to VOC, but no significant difference was observed in conditions of VOC and the convalescent phase. Even though platelet level had no statistical difference in SCA patients, it was higher than in the HD group. SCA patients, regardless of inflammatory status, showed higher involvement of lymphocytes and platelets.

SCA is marked by an inflammatory molecule profile regardless of clinical condition

With the aim of characterizing the profile of serum biomarkers in SCA patients, a range of soluble mediators were quantified in StSt, VOC groups and

compared to the HD group. Significantly higher levels of chemokines (CXCL8, CXCL10, CCL3, CCL4, CCL5), cytokines (IL-1 β , IL-12p70, IL-17A, IL-10), growth factors (VEGF and GM-CSF) and anaphylatoxin C4a were found in SCA patients, when compared to the HD group, as shown in Figure 1. Chemokines seemed to be more involved in VOC, when compared to StSt, through increased levels of CCL3, CCL5 and CCL11 (Fig. 1A). Furthermore, IL-4 and IL-5 levels were higher (Fig. 1B). The inflammatory status observed in the StSt group was characterized by an increased concentration of the pro-inflammatory molecules IL-1 β , TNF- α , IL12p70, IFN- γ and IL-17A, despite there being higher circulating levels of IL-10, GM-CSF, C4a and C5a, when compared to the VOC group (Fig.1 AC and 1D). In addition, in our molecule analysis we observed that patients in the VOC group have significantly higher median values of cell proliferation markers.

Signature of immune molecules presented by HD, StSt and VOC groups

Figure 2 summarizes the biomarker signatures and presents the Venn diagram of immunological molecules, with respective intersections and elements for the HD, StSt and VOC groups. Our aim was to describe which group was classified as being the highest producer of molecules, and which belong exclusively to each group (Fig. 2A). Inflammatory status in the StSt group showed that the majority of patients have increased levels of 22 soluble immune molecules, while the StSt group presented as higher producers of only six: CCL2, IL-1 β , IL-12p70, IFN- γ , IL-17A and GM-CSF, based on the majority of patients and the global median (Fig. 2B). Our analysis did not identify any molecule that all three groups share as high producers, however, the HD and StSt groups both showed higher production of TNF- α , C5a and IL-6, and SCA patients, regardless of inflammatory status presented themselves as higher producers of 13 immune molecules (Fig. 2B). Although 19 molecules were

identified as having higher production in VOC, only six were shown exclusively in this stage: IL-2, IL-7, IL-4, IL-5, PDGF-BB and G-CSF, which suggests that the VOC condition is orchestrated not just by anti-inflammatory cytokines, but also by intense cell proliferation (Fig. 2B).

Potential of immunological markers IL-1 β , IL-10, IL-1ra and IL-6 for distinguishing clinical conditions (StSt, VOC and CV) in SCA patients

The heatmap analysis was performed with the serum levels of the immune molecules of SCA patients to demonstrate the components used in the clustering of the StSt or VOC subgroups when compared to the healthy individuals. Even though histograms of the comparison of the HD (top bar yellow) group with the SCA StSt (top bar red) group (Fig. 3A) and the VOC (top bar green) group (Fig. 3B) had better clustering when compared to SCA patients, our tree decision analysis for SCA subgroups highlighted IL-10 and IL-1ra levels as the major attributes for characterizing healthy individuals and patients in StSt based on molecule profile, with a global accuracy of 100%, which reached 96% after LOOCV (Fig. 3C). Analysis showed that circulating levels of IL-10 when ≤ 17.56 pg/ml indicated an HD group, while when > 17.56 pg/ml, a further analysis contributed to identify HD if IL-1ra > 62.88 pg/ml or StSt if IL-1ra ≤ 62.88 pg/ml (Fig. 3C). In order to characterize the HD and VOC groups, the serum biomarker levels contributed to cluster the HD group if IL-1 β > 0.43 pg/ml or VOC if IL-1 β ≤ 0.43 pg/ml with 100% accuracy, which reached 98% after LOOCV (Fig. 3D). Under SCA subgroups, IL-1 β can also be used to categorize StSt patients, when > 0.43 pg/ml, or if < 0.43 pg/ml, a further analysis contribute to identify VOC if IL-6 > 2.66 pg/ml or CV if IL-6 ≤ 2.66 pg/ml (Fig. 3E).

Hallmarks of immune molecules in acute-to-chronic SCA patients after VOC

A follow-up was performed in patients during the VOC condition, which compared samples obtained on admission and after convalescence. By analyzing the results obtained, we could identify the most sensitive markers of SCA physiopathology after VOC recovery. The median time between sample collection was 53 days. However, our results show that the inflammatory profile did not change significantly. Both the VOC and the CV states maintained a similar immunological profile, with the exception of CXCL8, CCL4, IL-1ra and PDGF-BB (Fig. 4A, 4B and 4C). Even though CXCL8 and CCL4 had significantly lower levels in CV, there was no observed difference in median values in StSt and VOC groups, which was different from IL-1ra and PDGF-BB. As shown in Figure 1 and 4, hallmarks of acute-to-chronic transition can be marked by all four of these molecules, although only IL-1ra and PDGF-BB showed significant differences in both states.

SCA patients display a complex correlation network with different involvement in immune molecules based on inflammatory status

Despite the function of most immune molecules being already known, correlation analysis allows us to observe interaction among the groups. Thus, we observed that correlation analysis in the HD group and the SCA StSt and VOC patients had different patterns. While StSt patients have less interactions, a chronic inflammatory condition mediated by monocyte, driven by IL-17A, IL-12p70, CXCL10 and CCL4 (Fig. 5B) can be seen when compared to the HD group (Fig. 5A). In contrast, the VOC group had an increase in correlation molecules, which was highlighted by the inflammatory pattern and polarized to an anti-inflammatory response, and showed a main interaction of IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A, FGFb and GM-CSF (Fig. 5C). Besides the strong and positive correlations observed, GM-CSF and IL-1ra had a strong but negative correlation. The CV group network

had a lower correlation index (Fig. 5D), although the molecules described in VOC still seemed to have higher participation in the acute-to-chronic inflammation process.

Correlation matrices further corroborate these findings and highlight that while HD (Fig. 6A) displayed a hallmark network with an overall moderate connectivity and the StSt group (Fig. 6B) presented a panoramic network with less neighborhood connections, the VOC patients exhibited a higher level of immune marker connectivity, particularly within the cytokine axis (Fig. 6C). As the VOC group shift toward the CV group, a clear downregulation of biomarker connectivity can be observed.

DISCUSSION

SCA is marked by intense inflammation that is secondary to systemic injury and clinical status. The inflammatory process is evidenced by several interactions of cells, such as neutrophils, monocytes, platelets and RBCs, which are involved in the pathogenesis of this condition. Accordingly, immunological molecules, especially cytokines, chemokines, growth factors and anaphylatoxins are also relevant as regulators of this process. Although several studies have evaluated the levels of these molecules and their association with clinical characteristics of SCA, little evidence is available regarding the interaction of these molecules in the individuals with SCA, particularly during VOC and in the transition from the acute-to-chronic state after a VOC. The main finding of our study was the ability to use IL-1 β , IL-10 and IL-1ra levels to segregate subgroups of SCA patients.

Patients in StSt have less disease severity and show no threatening clinical symptoms, in comparison to those patients in crisis. Even with no severe symptoms, inflammatory markers are still present, in comparison to healthy controls. In addition, these molecules are involved in immune response that contributes to vaso-occlusion

episodes (3,8,24). The chronic inflammation in StSt seem to be characterized by increased levels in the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-12p70, IFN- γ and circulating cells but with less endothelial involvement, similarly to what has been observed in other studies (18,25–28). It has already been established that neutrophils, monocytes and pro-inflammatory molecules, together with platelets, play an important role in disease severity (3,9,26,29). Increased levels of IL-10 in the StSt has been described as part of T-cell differentiation (30), VOC development and disease severity (31), suggesting that this cytokine participates in the process of regulating the pro-inflammatory state. Furthermore, other factors, such as infectious or other genetic diseases, influence inflammatory response and contribute to vaso-occlusion, thus, reducing patient's life expectancy (1,10).

Acute inflammation is characterized by local ischemia/reperfusion injury, leukocyte recruitment and circulating cell activation, which contribute to severe clinical symptoms in a VOC (3,8). Some studies describe the participation of anti-inflammatory cytokines in this condition (8,20,24,30) and, in addition, our results show that it is marked mainly by IL-1ra and IL-4 molecules, with involvement of adherent neutrophils and monocytes. Many studies have focused on differences in molecule levels in StSt and VOC (17–19,32), However few studies have focused on immunological hallmarks, which can be used to describe the transition between inflammatory states (StSt, VOC and convalescence). Increased levels of IL-2 and IL-7, together with growth factors, have been previously observed (20) and contribute to proliferation and maturation of granulocytes. In addition, the findings regarding chemokines support the statement that these circulating cells show a higher capacity to adhere to endothelial cells and form cell-to-cell and cell-endothelium aggregates in VOC, which contributes to endothelial injury, inflammatory marker production, immune cell recruitment, vaso-occlusion and consequently severe clinical

complications, as described by other authors (3,10,29,30,33). Our data demonstrated that VOC patients displayed a lack of canonical pro-inflammatory factors and a clear increase in regulatory mediators. This may suggest that VOC is not an anti-inflammatory condition per se, but it may be linked to a skew in the 'type' of inflammation rather than its magnitude/strength. The analysis of biomarker networks and the correlation matrices between pairs of soluble mediators demonstrated that there is strong connectivity between pro-inflammatory/regulatory cytokines in VOC. The strength of IL-1 β connections in VOC was noteworthy and may suggest that the inflammasome activation may participate in SCA pathophysiology.

We identified that the alternative pathway of the complement system is not that different under StSt or VOC, contrary to what has been described by other authors. IL-1 β and IL-17A might be indirectly related to classical activation of the complement system through C-reactive protein (CRP) production from the liver (32,34–36), and further interaction with natural antibodies (37), culminating in higher C4 cleavage rate. Free heme interacts with C1q ligands (CRP and immunoglobulin) and leads to less classical complement activation in VOC (38); and with C3, culminating on higher C3 cleavage rate (39,40). Free heme availability and its direct and indirect interaction to complement molecules may explain why the SCA groups had no significant difference in C3a levels. This increased activation of the complement pathway has already been described in StSt patients and observed in our results (41). Little information related to the involvement of the complement system in SCA is available, but even though the production of anaphylatoxins is well defined, the function of anaphylatoxins as inflammatory or regulatory molecules remains unclear in SCA pathophysiology.

Surprisingly, both HD and StSt groups were identified as higher producers of the pro-inflammatory molecules TNF- α and IL-6, although only TNF- α levels were

significantly higher in VOC, though not IL-6, as observed in some studies (18,27,28) and in contrast to others (17,20,32,36,42–44). VOC was characterized as being a higher producer of anti-inflammatory and immune cell proliferation cytokines. It is important to notice that IL-4 and IL-5 are also produced by activated mast cells, in which have been reported during VOC in mice, and are important contributor on pain (14). Even though higher levels of some cytokines have been described by other authors, this characterization has never been described before for SCA patients.

Complementarily, our bioinformatic analysis permitted the segregation of SCA patients based on circulating IL-1 β , IL-10, IL-1ra and IL-6 levels, and regardless of their role, we described these molecules as potential hallmarks for segregating these patients into StSt, VOC and CV groups. The decision trees show novel proposals for biomarkers that should to be investigated in further studies for a better comprehension of SCA physiopathology and thus may contribute to better clinical decisions.

The CV group was an intermediary period in VOC and StSt stages, for which we observed that the first inflammatory mediators to decrease were CXCL8, CCL4, IL-1ra and PDGF-BB after hospital release after a VOC episode. However, only IL-1ra and PDGF-BB presented statistical differences in VOC and StSt groups. Even though IL-1ra is known to be an anti-inflammatory marker, its concentration was related to increased events of pain (45). As such, we believe that these results may contribute to the SCA patient's follow-up after treatment for VOC episodes. In addition, the correlations allowed us to identify that, during this acute-to-chronic transition, some interactions in the main molecules responsible for cell proliferation still remain, which indicates that there still is stimulus for leukocytosis, even though the inflammation pattern does not differ that much from VOC.

A strong and positive correlation under TNF- α and GM-CSF in VOC was identified in our analysis, which sustains a positive inflammatory pattern, with further leukocyte recruitment and activation, especially neutrophils and monocytes (9,33). Negative feedback is observed in both StSt and VOC conditions, the first is mediated by IL-10, while the second by IL-1ra, which is an inactive antagonist of IL-1 β . This statement is supported by the IL-10/CXCL10 and IL-1ra/GM-CSF axis in StSt and VOC, respectively. IL-10's role as a biomarker in SCA is still controversial, since some authors describe lower levels in StSt, when compared to the control group, together with CXCL10 (43), while others found increased levels (20,30,46,47) and some show no difference (17).

The present study has some limitations. Since SCA is considered a sterile inflammatory disease, the assessment of the TLRs expression, as well as the analysis of checkpoints in immune cell subsets along with quantification of other cytokines (IL-1a, IL-18 and IL-33), would provide a more detailed description regarding the inflammasome activation in order to more fully understand SCA pathophysiology and allow for the identification of novel prognostic factors. These aspects remain to be elucidated in future investigations.

Our study brought new perspectives for inflammatory knowledge of SCA. In fact, the role of many molecules in SCA is still discussable whether inflammatory or regulatory, as well as their association to a VOC development or as a consequence of a VOC.

CONCLUSION

Herein, we highlight the interactions of IL-4 and IL-2 cytokines in VOC, as well as the efficacy of IL-1ra and PDGF-BB as markers of clinical recovery post-VOC. In addition, we describe the ability of IL-10 and IL-1ra levels to cluster patients into

HD or StSt, and IL-1 β levels to cluster patients into HD or VOC. Our results contribute to novel markers in the Brazilian Amazon SCA population, and suggest their potential in prognosis and follow-up after hospital recovery from VOC. The present study is the first report on inflammatory hallmarks in VOC and CV in sickle cell anemia patients and supports greater understanding of disease pathophysiology mechanisms in order to identify novel inflammatory biomarkers and contribute to therapeutic perspectives.

AUTHOR CONTRIBUTION

AS-J, AC and AM designed, performed the experiments, analyzed data and wrote the manuscript. AS-J, MG, LA, OAM-F and AC analyzed data. AS-J, NG, EC, SD and AT recruited all individuals, performed the experiments and revised the manuscript. NF, AT-C and EV revised the manuscript. AS-J, NG, AT, OAM-F, AT-C and AM supervised the project development, designed the experiments, interpreted the data, wrote and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health (PDTIS-FIOCRUZ) for the use of its facilities and Flow Cytometry Platform at HEMOAM. We are grateful to Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores at Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz of Minas Gerais state (FIOCRUZ-MG) for excellent technical assistance and support with the assays (collaboration of the technical assistants Ana Carolina Campi-Azevedo and Elaine Spezziali).

FUNDING

This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (Pró-Estado Program - #002/2008, #007/2018 and #005/2019, PAMEQ Program - #004/2019 and PAPAC Program - #005/2019), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (PROCAD-Amazônia 2018 Program - #88881.200581/2018-01). AS-J, EC, SD have fellowship from CAPES and FAPEAM (Ph.D., Master and SI students). OAM-F is level 1 research fellow from CNPq and a research fellow from FAPEAM (PVN-II, Pró-Estado Program - #002/2008, #007/2018 and #005/2019). AT-C and AM are level 2 research fellows from CNPq. The funders had no participation in study design, sample and data collection, analysis and manuscript development.

CONFLICT OF INTEREST

All authors declared to have no conflict of interest related to this study.

REFERENCES

1. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med.* 2017;376(16):1561–73.
2. Faes C, Sparkenbaugh EM, Pawlinski R. Hypercoagulable state in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;68(2–3):301–18.
3. Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. 2018;(October):261–90.
4. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet.* 2010;376:2018–31.

5. Naoum PC. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2000;22(1):5–22.
6. Vekilov PG. Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia ? *Br J Haematol.* 2007;139(1):173–84.
7. Neto GC de G, Pitombeira M da S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *J Bras Patol e Med Lab.* 2003;39(1):51–6.
8. Zhang D, Xu C, Manwani D, Frenette PS. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood J.* 2016;127(7):801–10.
9. Garcia NP, Júnior ALS, Soares GAS, Costa TCC, Santos APC dos, Costa AG, et al. Sickle Cell Anemia Patients Display an Intricate Cellular and Serum Biomarker Network Highlighted by TCD4+CD69+ Lymphocytes, IL-17/MIP-1 β , IL-12/VEGF, and IL-10/IP-10 Axis. *J Immunol Res.* 2020;2020.
10. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Prim.* 2018;4:1–22.
11. Xu H, Wandersee NJ, Guo Y, Jones DW, Holzhauer SL, Hanson MS, et al. Sickle cell disease increases high mobility group box 1: a novel mechanism of inflammation. *Blood.* 2014;124(26):3978–82.
12. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim J-Y, Strassheim D, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2006;290(3):917–24. Available from: <http://ajpcell.physiology.org/content/290/3/C917.abstract>
13. Conran N, de Paula E V. Thromboinflammatory mechanisms in sickle cell disease - challenging the hemostatic balance. *Haematologica.* 2020;105(8):1–11.
14. Vincent L, Vang D, Nguyen J, Gupta M, Luk K, Ericson ME, et al. Mast cell

- activation contributes to sickle cell pathobiology and pain in mice. *Blood*. 2013;122(11):1853–62.
15. Merle NS, Boudhabhay I, Leon J, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement activation during intravascular hemolysis: Implication for sickle cell disease and hemolytic transfusion reaction. *Transfus Clin Biol* [Internet]. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2019.02.008>
 16. Adisa OA, Hu Y, Ghosh S, Aryee D, Osunkwo I, Ofori-Acquah SF. Association between plasma free haem and incidence of vaso-occlusive episodes and acute chest syndrome in children with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2013;162(5):702–5.
 17. Cavalcante JEA, Machado RPG, Laurentino MR, Santos TE de J dos, Bandeira ICJ, Filho PAM, et al. Clinical events and their relation to the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genotypes in Sickle-Cell- Anemia patients. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2016;9:14–9.
 18. Barbu EA, Mendelsohn L, Samsel L, Thein SL. Pro-inflammatory cytokines associate with NETosis during sickle cell vaso-occlusive crises. *Cytokine* [Internet]. 2020;127(154933):1–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154933>
 19. Adegoke SA, Kuti BP, Omole KO, Smith OS, Oyelami OA, Oyewole O. Paediatrics and International Child Health Acute chest syndrome in sickle cell anaemia : higher serum levels of interleukin-8 and highly sensitive C-reactive proteins are associated with impaired lung function. *Paediatr Int Child Health* [Internet]. 2018;00(00):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1080/20469047.2018.1519988>.
 20. Rees DC, Gibson JS. Biomarkers in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2011;156(1):433–45.

21. Asare K, Gee BE, Stiles JK, Wilson NO, Driss A, Quarshie A, et al. Plasma interleukin-1 β concentration is associated with stroke in sickle cell disease. *Cytokine*. 2010;49(1):39–44.
22. Ibiapina HNS, Costa AG, Sachett JAG, Silva IM, Tarragô AM, Neves JCF, et al. An Immunological Stairway to Severe Tissue Complication Assembly in *Bothrops atrox* Snakebites. *Front Immunol*. 2019;10(1882):1–12.
23. Taylor R. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. *J Diagnostic Med Sonogr*. 1990;6(1):35–9.
24. Pathare A, Kindi SAL, Daar S, Dennison D. Cytokines in Sickle Cell Disease. *Hematology*. 2003;8(5):329–37.
25. Vilas-boas W, Cerqueira BAV, Figueiredo CVB, Santiago RP, Guarda CC da, Pitanga TN, et al. Association of homocysteine and inflammatory-related molecules in sickle cell anemia. *Hematology*. 2015;1–6.
26. Silva RR da, Pereira MC, Rêgo MJBM, Hatzlhofer BLD, Araújo A da S, Bezerra MAC, et al. Cytokine Evaluation of Th17 related cytokines associated with clinical and laboratorial parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine* [Internet]. 2014;65(2):143–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.11.012>
27. Keikhaei B, Mohseni AR, Norouzirad R, Alinejadi M, Ghanbari S, Shiravi F, et al. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. *Eur Cytokine Netw*. 2013;24(1):45–52.
28. Veiga PC, Schroth RJ, Guedes R, Freire SM, Nogueira-Filho G. Serum cytokine profile among Brazilian children of African descent with periodontal inflammation and sickle cell anaemia. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2013;58(5):505–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.11.006>

29. Villagra J, Shiva S, Hunter LA, Machado RF, Gladwin MT, Kato GJ. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood*. 2007;110(6):2166–73.
30. Musa BOP, Onyemelukwe GC, Hambolu JO, Mamman AI, Isa AH. Pattern of Serum Cytokine Expression and T-Cell Subsets in Sickle Cell Disease Patients in Vaso-Occlusive Crisis. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(4):602–8.
31. Sarray S, Saleh LR, Saldanha FL, Al-habboubi HH, Mahdi N, Almawi WY. Cytokine Serum IL-6, IL-10, and TNF α levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. *Cytokine* [Internet]. 2015;72(1):43–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.11.030>
32. Pathare A, Al Kindi S, Alnaqdy AA, Daar S, Knox-Macaulay H, Dennison D. Cytokine Profile of Sickle Cell Disease in Oman. *Am J Hematol*. 2004;77(4):323–8.
33. Makis AC, Hatzimichael EC, Bourantas KL. The role of cytokines in sickle cell disease. *Ann Hematol*. 2000;79(1):407–13.
34. Beers EJ Van, Yang Y, Raghavachari N, Tian X, Allen D, Nichols J, et al. Iron, Inflammation and Early Death with Sickle Cell Disease. *Circ Res*. 2015;116(2):298–
35. Eklund CM. PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN CRP BASELINE REGULATION. *Adv i Clin Chem*. 2009;48(09):111–36.
36. Damanhoury GA, Jarullah J, Marouf S, Hindawi SI, Mushtaq G, Kamal MA. Clinical biomarkers in sickle cell disease. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2015;22(1):24–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.09.005>
37. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 8.

2015. 1195 p.
38. Roumenina LT, Rayes J, Lacroix-Desmazes S, Dimitrov JD. Heme: Modulator of Plasma Systems in Hemolytic Diseases. *Trends Mol Med* [Internet]. 2016;22(3):200–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2016.01.004>
 39. Merle NS, Noe R, Halwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part II: role in immunity. *Front Immunol*. 2015;6(257):1–26.
 40. Merle NS, Grunenwald A, Rajaratnam H, Gnemmi V, Frimat M, Figueres M, et al. Intravascular hemolysis activates complement via cell-free heme and heme-loaded microvesicles. *JCI insight*. 2018;3(12):1–17.
 41. Gavriilaki E, Mainou M, Christodoulou I, Koravou E-E, Paleta A, Touloumenidou T, et al. In vitro evidence of complement activation in patients with sickle cell disease. *Haematologica*. 2017;102(1):481–2.
 42. Qari MH, Dier U, Mousa SA. Biomarkers of Inflammation, Growth Factor, and Coagulation Activation in Patients With Sickle Cell Disease. *Clin Appl Thromb*. 570 2012;18(2):195–200.
 43. Hibbert JM, Hsu LL, Bhatena SAMJ, Irune I, Sarfo B, Creary MS, et al. Proinflammatory Cytokines and the Hypermetabolism of Children with Sickle Cell Disease. *Exp Biol Med*. 2004;230(1):68–74.
 44. Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad STO, 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;85:235–42.
 45. Zhang J-M, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesth Clin*. 2007;45(2):27–37.
 46. Pitanga TN, Oliveira RR, Zanette DL, Guarda CC, Santiago RP, Santana SS, et

- al. Sickle red cells as danger signals on proinflammatory gene expression, leukotriene B₄ and interleukin-1 beta production in peripheral blood mononuclear cell. *Cytokine* [Internet]. 2016;83(1):75–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2016.03.016>.
47. Safaya S, Steinberg MH, Klings ES. Monocytes from sickle cell disease patients induce differential pulmonary endothelial gene expression via activation of NF- κ B signaling pathway. *Mol Immunol* [Internet]. 2012;50:117–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2011.12.012>

CAPTION OF FIGURES AND TABLE

Fig. 1. SCA patients in VOC (■) condition show an anti-inflammatory cytokine profile, when compared to StSt (■) and HD (□) groups. Statistically significant values were considered when $p < 0.05$, and are presented as * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Chemokines (A), cytokines (B) and growth factors (C) were measured using Luminex, and anaphylatoxins (D) measured using CBA. Data is presented as median values and interquartile range in pg/ml. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis and Dunn's Multiple Comparison Test. HD: healthy donors; StSt: Steady-State; VOC: Vaso-occlusive crisis.

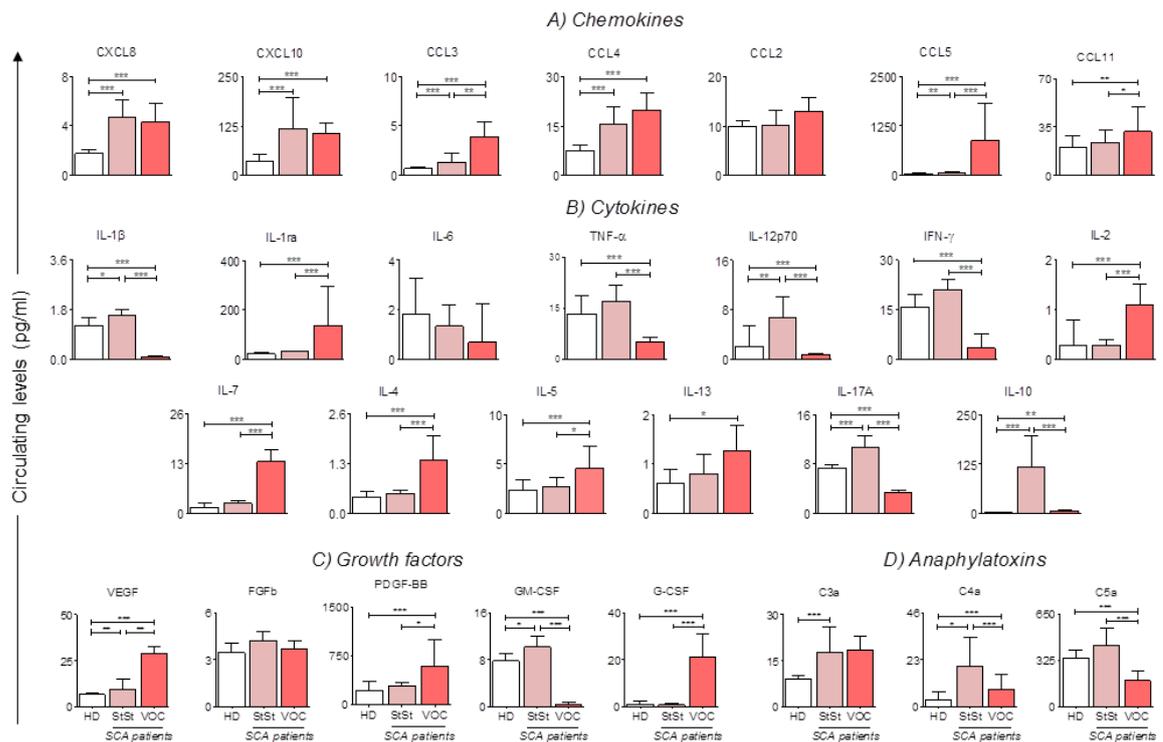
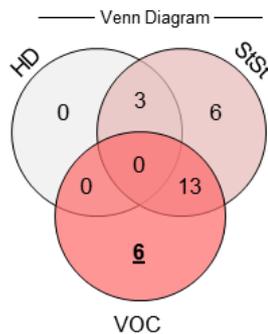
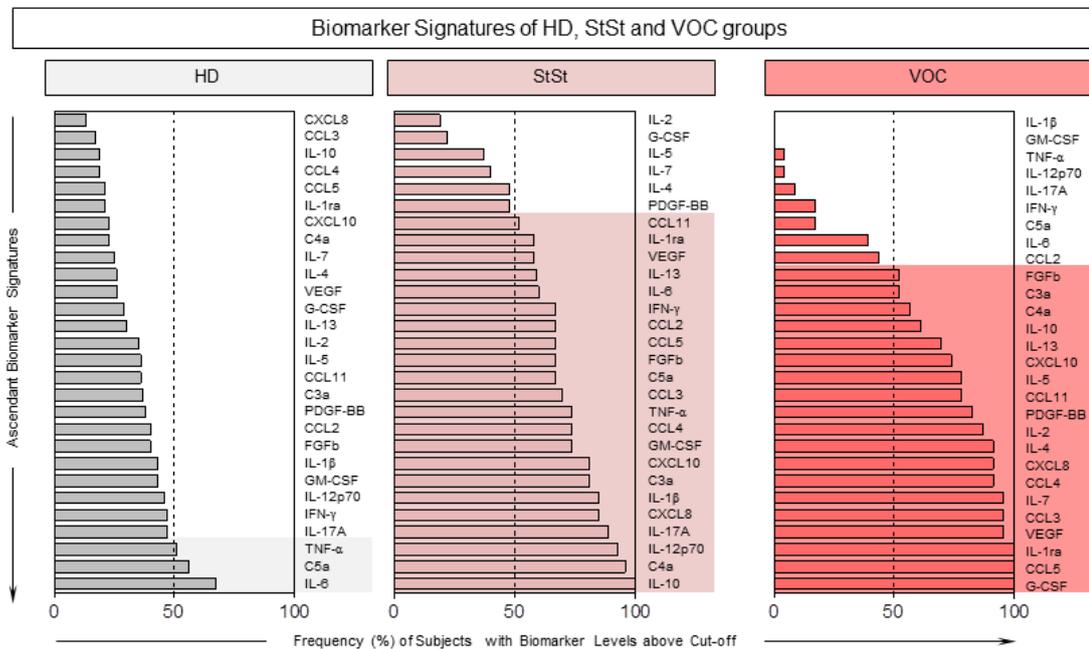


Fig. 2: Immunological molecules in VOC clinical condition of SCA patients presented in a Venn diagram. The elements describe which molecules are potential hallmarks for each clinical condition and controls. Molecules were measured using Luminex and CBA. The global median for each soluble molecule was calculated and used as a cut-off point in order to classify groups as low (<50%) or high (>50%) producers of chemokines, cytokines, growth factors and anaphylatoxins. HD: healthy donors; StSt: steady-state; VOC: Vaso-occlusive crisis.



Venn Diagram Report

Groups	Intersections	Elements
StSt	6	CCL2, IL-1 β , IL-12p70, IFN- γ , IL-17A and GM-CSF
HD / StSt	3	IL-6, TNF- α and C5a
StSt / VOC	13	CXCL8, CXCL10, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, IL-1ra, IL-13, IL-10, VEGF, FGFb, C3a and C4a
VOC	6	IL-4, IL-5, IL-2, IL-7, PDGF-BB, G-CSF

Fig. 3: Bioinformatic analysis of serum molecules divided into the attributes of the control group and SCA subgroups according to clinical condition, represented by heatmaps (A and B) and decision trees (C, D and E) of z-score normalized events. A) Molecule attributes showed the ability to cluster healthy individuals and steady-state SCA patients; B) Heatmap analysis also shows high ability to distinguish controls and vaso-occlusive SCA patients; C) Decision tree analysis provides the clustering based on IL-10 circulating levels in order to classify individuals as HD if ≤ 17.56 pg/ml or if > 17.56 pg/ml, analyze IL-1ra level to categorize as HD if > 62.88 pg/ml or as StSt if ≤ 62.88 pg/ml; D) Decision tree analysis provides clustering of HD and VOC groups based on IL-1 β circulating levels in order to categorize individuals as HD if > 0.43 pg/ml or as VOC if ≤ 0.43 pg/ml; E) Decision tree analysis provides clustering of SCA patients based on IL-1 β circulating levels in order to classify individuals as StSt if > 0.43 pg/ml or if ≤ 0.43 pg/ml, analyze IL-6 level to categorize as VOC if > 2.66 pg/ml or as CV if ≤ 2.66 pg/ml. HD: healthy donors; StSt: steady-state; VOC: Vaso-occlusive crisis; CV: Convalescence; LOOCV: Leave-One-Out Cross Validation.

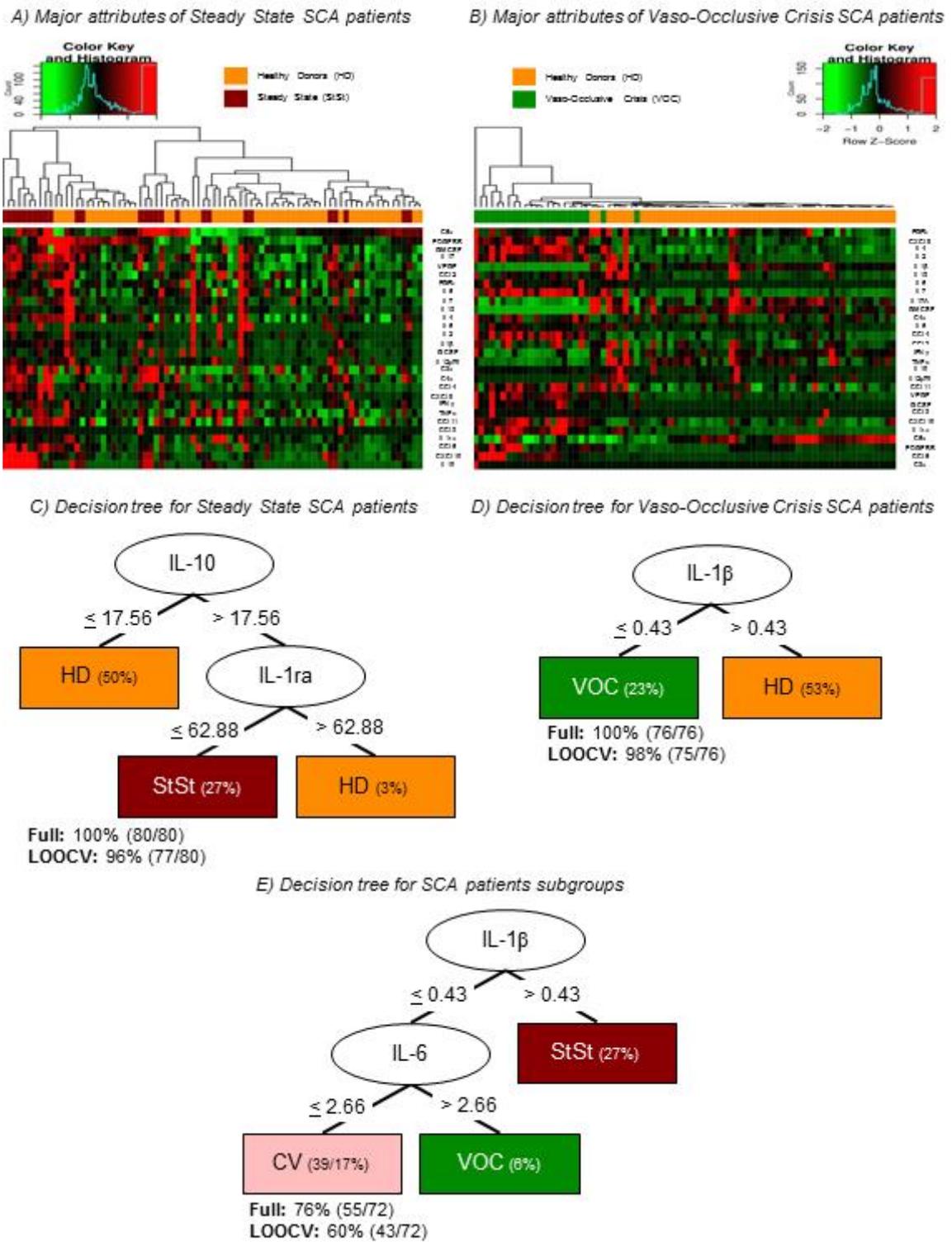


Fig. 4. Analysis of the first molecules that decrease after crisis, when compared with VOC (■) and CV (■) groups. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test. A p value < 0.05 was considered statistically significant and was presented as * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Chemokines (A), cytokines (B) and

growth factors (C) were measured using Luminex, and anaphylatoxins (D) using CBA. Data is shown as median values and interquartile range, using data in pg/ml. VOC: Vaso-occlusive crisis; CV: Convalescence.

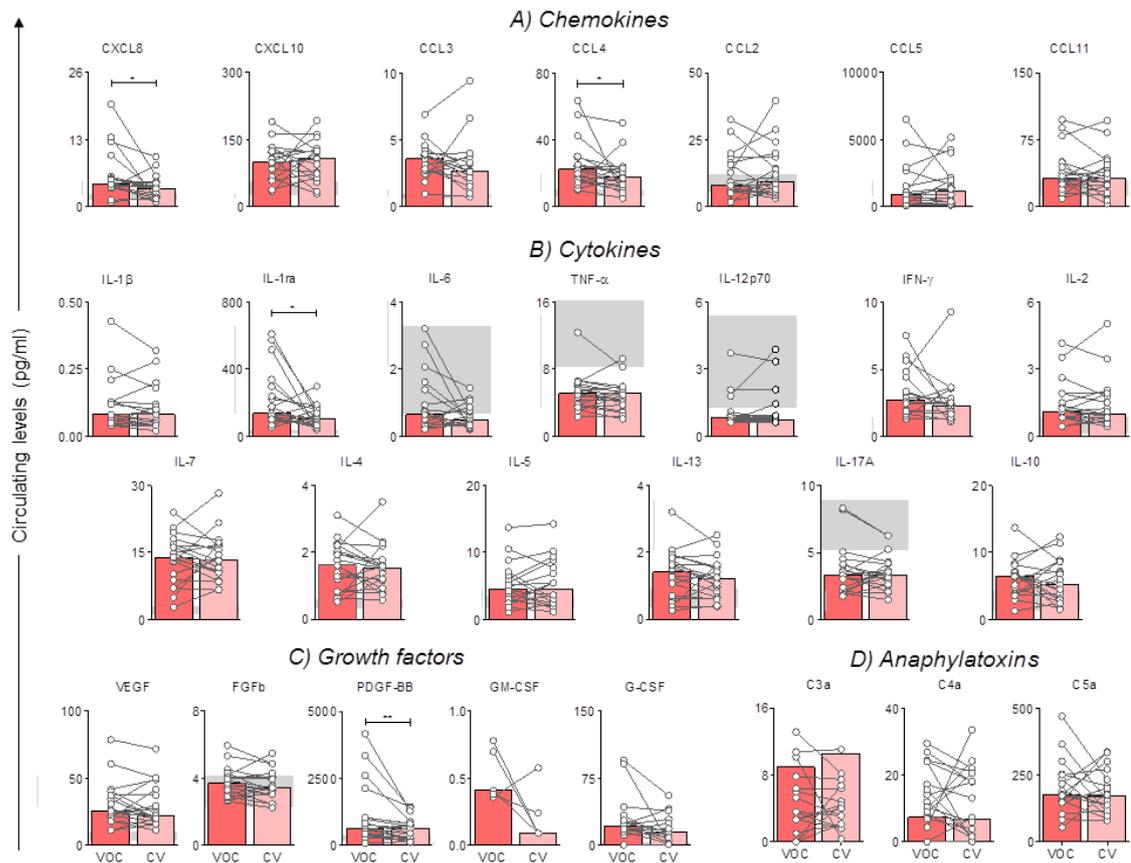


Fig. 5: Correlation analysis presented as a network of immunological cytokines, chemokines, growth factors, anaphylatoxins and leukocytes in healthy donors, steady state, vaso-occlusive crisis and convalescence stages. Each parameter is shown in a node. Statistical analysis was performed using the Spearman correlation test and the significant correlations ($p < 0.05$) are represented by a line connecting both nodes. The correlation was classified as weak ($r < 0$), moderate ($0.36 < r < 0.68$) and strong ($r > 0.68$), based on absolute value of correlation index r , represented by line thickness. Positive correlation is expressed by a continuous line, while negative correlation by dashed lines. NEU: Neutrophil;

LYMP: Lymphocytes; MON: Monocytes; EOS: Eosinophils; BAS: Basophils; PLT: Platelets; MPV: Mean platelet volume; chemokines (CXCL8; CXCL10; CCL3; CCL4 ; CCL2; CCL5; CCL11), cytokines (IL-1 β ; IL-1ra; IL-6; TNF- α ; IL-12p70; IFN- γ ; IL-2; IL-7; IL-4; IL-5; IL-13; IL-17A; IL-10), growth factors (VEGF; FGFb; PDGF; GM-CSF; G-CSF) and anaphylatoxins (C3a; C4a; C5a). HD: healthy donors; StSt: steady-state; VOC: Vaso-occlusive crisis; CV: Convalescence.

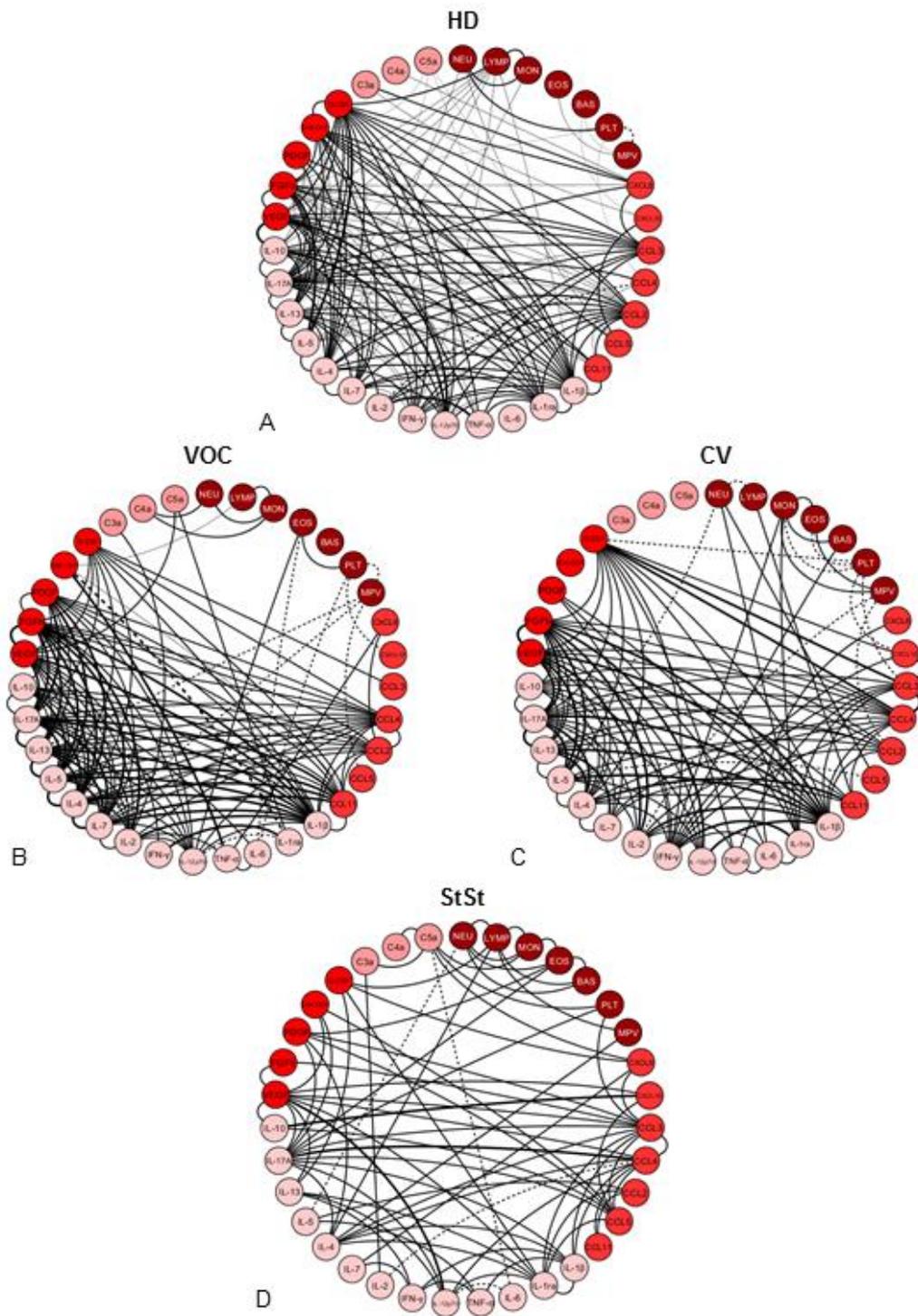


Fig. 6: Biomarker correlation matrices illustrate distinct patterns of biomarker connectivity in healthy donors, steady-state, vaso-occlusive crisis and convalescence stages. Biomarker networks were based on the Spearman's correlation indices (r). Correlation matrices display significant association ($p < 0.05$) between biomarker pairs based on the rank indices, which are tagged by color keys,

ranging from -1.0 to 1.0 to underscore the correlation strength, according to the color key provided in the Figure. NEU: Neutrophil; LYMP: Lymphocytes; MON: Monocytes; EOS: Eosinophils; BAS: Basophils; PLT: Platelets; MPV: Mean platelet volume; chemokines (CXCL8; CXCL10; CCL3; CCL4 ; CCL2; CCL5; CCL11), cytokines (IL-1 β ; IL-1ra; IL-6; TNF- α ; IL-12p70; IFN- γ ; IL-2; IL-7; IL-4; IL-5; IL-13; IL-17A; IL-10), growth factors (VEGF; FGFb; PDGF; GM-CSF; G-CSF) and anaphylatoxins (C3a; C4a; C5a). HD: healthy donors; StSt: steady-state; VOC: Vaso-occlusive crisis; CV: Convalescence.

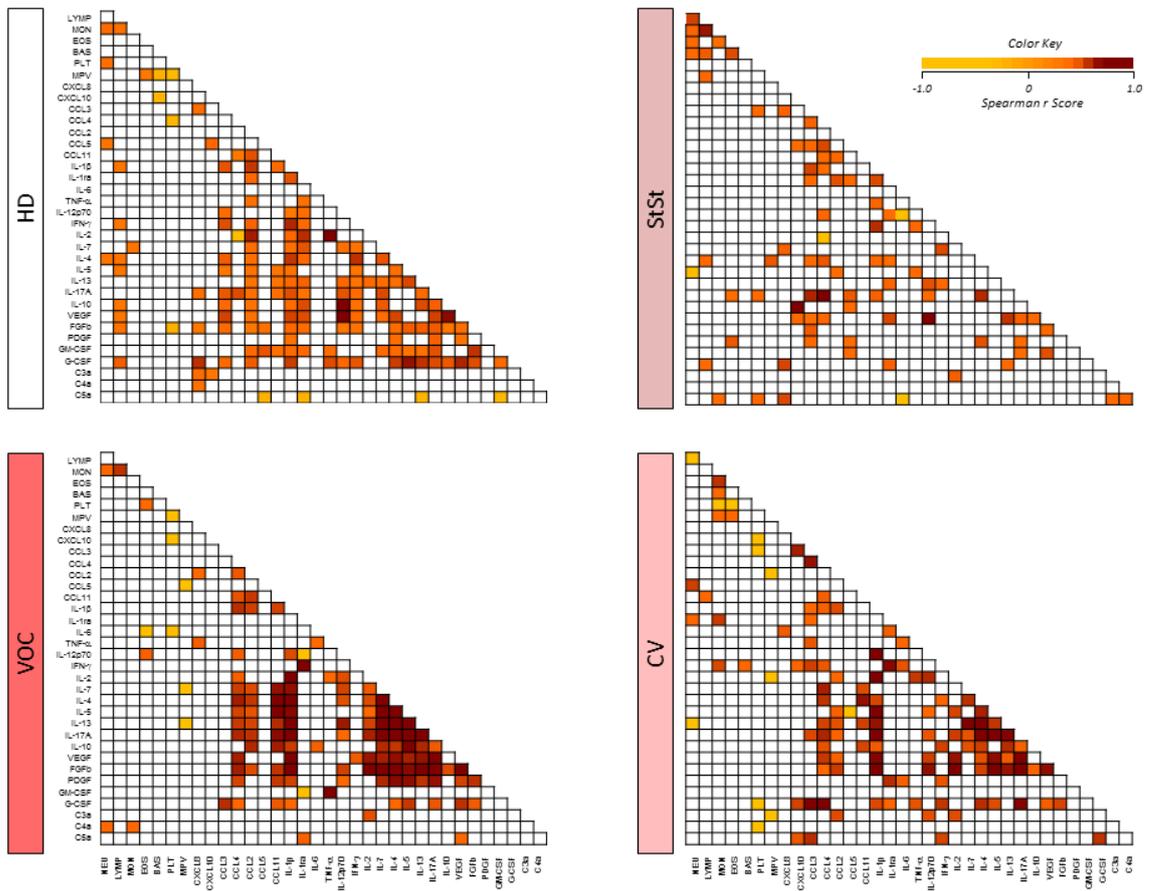


Table 1. Epidemiological data of HD group and SCA patients, showing age, gender, place of residence and chronic pharmacological treatment.

Variables	HD n = 53	StSt n = 27	VOC n = 22	CV n = 22	p value
Age (years, median [IQR])	30 [23-42]	30 [22-34]	22 [14-34]	22 [14-34]	0.032
Gender, n (%)					
Male	37 (70)	9 (37)	11 (50)	11 (50)	0.016^a
Female	16 (30)	18 (67)	11 (50)	11 (50)	
City of residence, n (%)					
Manaus-AM	53 (100)	23 (85)	20 (91)	20 (91)	0.063
Interior of Amazonas	-	4 (15)	2 (9)	2 (9)	
Chronic pharmacological treatment, n (%)					
Folic acid	-	25 (93)	17 (77)	17 (77)	0.219
Hydroxyureia	-	22 (81)	14 (63)	14 (63)	0.202
Analgesic	-	12 (44)	12 (54)	12 (54)	0.570
Corticoid	-	2 (7)	-	-	1
Antinflammatory	-	1 (4)	5 (23)	5 (23)	0.077

HD: Healthy Donors; StSt: Steady State; VOC: Vaso-Occlusive Crisis; CV: Convalescence. ^a significant difference for HD vs. StSt; ^b significant difference for HD vs. VOC; ^c significant difference for SS vs. VOC; ^d significant difference for VOC vs. CV. Statistical analysis performed by Kruskal-Wallis with Dunn's Multiple Comparison Test for the variable of age in order to compare HD, and SS and VOC. In addition, Wilcoxon test was performed for VOC and CV comparison. Gender and city of residence was compared using a Chi-Square (χ^2) test. For both analyses, p was considered significant when < 0.05.

Table 2. Laboratorial data of hematological parameters from HD, StSt, VOC and CV groups.

Variables	HD n = 53	StSt n = 27	VOC n = 22	CV n = 22	p value
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$, median [IQR])	4.99 [4.59-5.40]	2.51 [2.19-2.75]	2.39 [2.09-2.94]	2.65 [2.29-3.12]	< 0.0001^{a,b}
Hemoglobin (g/dL, median [IQR])	14.90 [13.55-15.95]	8.0 [7.10-9.0]	7.50 [6.20-8.45]	8.30 [7.20-8.70]	< 0.0001^{a,b}
Hematocrit (% , median [IQR])	43.70 [40.45-47.30]	24.50 [21.70-28.50]	22.0 [18.60-25.0]	24.80 [21.95-26.68]	< 0.0001^{a,b,d}
MCV (fL, median [IQR])	87.80 [84.85-90.4]	99.90 [92.80-110.2]	91.30 [79.60-99.80]	90.55 [86.83-99.15]	< 0.0001^{a,c}
MCH (pg, median [IQR])	29.70 [28.90-30.60]	32.10 [30.30-36.70]	31.10 [27.35-33.20]	29.70 [27.58-34.03]	0.0008^a
MCHC (g/dL, median [IQR])	34.10 [33.10-34.60]	32.70 [31.90-34.10]	33.60 [32.90-34.05]	33.15 [32.40-33.95]	0.0057^a
RDW (fL, median [IQR])	13.70 [12.95-13.95]	18.20 [17.30-19.80]	21.20 [19.65-23.80]	19.95 [18.08-22.90]	< 0.0001^{a,b}
Reticulocyte ($\times 10^3/\mu\text{L}$, median [IQR])	72.70 [56.90-88.80]	367.6 [226.0-529.9]	257.4 [134.3-349.2]	248.6 [134.5-332.8]	< 0.0001^{a,b}
WBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$, median [IQR])	6.33 [5.27-7.10]	7.42 [5.95-9.44]	11.39 [8.82-15.17]	9.51 [8.07-11.38]	< 0.0001^{b,c}
Neutrophil ($\times 10^3/\mu\text{L}$, median [IQR])	3.43 [2.80-4.18]	3.39 [2.13-4.81]	6.90 [4.87-9.46]	4.88 [3.05-6.43]	< 0.0001^{b,c,d}
Lymphocyte ($\times 10^3/\mu\text{L}$, median [IQR])	1.84 [1.55-2.16]	2.41 [2.13-3.36]	3.02 [2.32-4.78]	3.28 [2.43-4.96]	< 0.0001^{a,b}

Monocyte ($\times 10^3/\mu\text{L}$, median [IQR])	0.38 [0.29-0.41]	0.43 [0.33-0.69]	0.66 [0.52-0.86]	0.60 [0.41-0.83]	< 0.0001^{b,c}
Basophil ($\times 10^3/\mu\text{L}$, median [IQR])	0.03 [0.02-0.05]	0.03 [0.03-0.05]	0.00 [0.00-0.03]	0.00 [0.00-0.04]	0.0002^{b,c}
Eosinophil ($\times 10^3/\mu\text{L}$, median [IQR])	0.19 [0.12-0.41]	0.24 [0.13-0.50]	0.22 [0.10-0.62]	0.42 [0.24-0.62]	0.6031
Platelet count ($\times 10^3/\mu\text{L}$, median [IQR])	244 [213-281.5]	420 [372-533]	411 [326-530]	460.5 [339.8-642.0]	< 0.0001^{a,b}

^a significant difference for HD vs. StSt; ^b significant difference for HD vs. VOC; ^c significant difference for StSt vs. VOC; ^d significant difference for VOC vs. CV. Statistical analysis performed using Kruskal-Wallis with Dunn's Multiple Comparison Test in order to compare HD, StSt and VOC. In addition, Wilcoxon test was performed for VOC and CV comparison. For both analyses, p was considered significant when < 0.05.

10.4.2. Artigo científico “Sickle Cell Anemia Patients Display an Intricate Cellular and Serum Biomarker Network Highlighted by TCD4+CD69+ Lymphocytes, IL-17/MIP-1 β , IL-12/VEGF, and IL-10/IP-10 Axis”

Hindawi
Journal of Immunology Research
Volume 2020, Article ID 4585704, 22 pages
<https://doi.org/10.1155/2020/4585704>



Research Article

Sickle Cell Anemia Patients Display an Intricate Cellular and Serum Biomarker Network Highlighted by TCD4+CD69+ Lymphocytes, IL-17/MIP-1 β , IL-12/VEGF, and IL-10/IP-10 Axis

Nadja Pinto Garcia ^{1,2}, Alexander Leonardo S. Júnior ³, Geysel Adriana S. Soares,⁴ Thainá Cristina C. Costa,³ Alicia Patrino C. dos Santos,⁴ Allyson Guimarães Costa ^{1,2,3}, Andréa Monteiro Tarragô ², Rejane Nina Martins,² Flávia do Carmo Leão Pontes,² Emerson Garcia de Almeida,³ Erich Vinicius de Paula,^{3,5} Olindo Assis Martins-Filho,⁶ and Adriana Malheiro ^{1,2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 69077-000 Manaus, AM, Brazil

²Laboratório de Genômica, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), 69050-001 Manaus, AM, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia, Universidade Estadual do Amazonas (PPCAH/UEA), 69065-001 Manaus, AM, Brazil

⁴Programa de Apoio a Iniciação Científica, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), 69050-001 Manaus, AM, Brazil

⁵Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

⁶Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou/Fiocruz Minas, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

Correspondence should be addressed to Nadja Pinto Garcia; garcia.nadja@gmail.com and Adriana Malheiro; malheiroadriana@yahoo.com.br

Received 15 April 2019; Revised 14 November 2019; Accepted 27 November 2019; Published 8 January 2020

Academic Editor: Martin Holland

Copyright © 2020 Nadja Pinto Garcia et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Sickle cell anemia (SCA) is associated with a chronic proinflammatory state characterized by elevated leukocyte count, mortality from severe recurrent infections, and subsequent vasoocclusive complications with leukocyte adhesion to the endothelium and increased plasma levels of inflammatory cytokines. The immune system has a close connection with morbidity in SCA, but further studies are needed to uncover the involvement of innate and adaptive immunities in modulating the SCA pathophysiology. We performed measurements of the frequency of innate and adaptive immunity cells, cytokines, chemokines, and growth factors and immunophenotyping of Toll-like receptor and adhesion molecule expression in the blood of SCA patients and healthy donors to evaluate the different profiles of these biomarkers, the relationship among them, and their correlation to laboratory records and death risk. **Material and Methods.** Immunophenotyping of cells, Toll-like receptors, and adhesion molecules were performed from peripheral blood samples of SCA patients and healthy donors by flow cytometry and cytokine/chemokine/growth factor measurement by the Luminex technique performed from the serum of the same subjects. **Results.** Cells of adaptive immunity such as IL-12, IL-17, and IL-10 cytokines; IL-8, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES chemokines; and VEGF, FGF-basic, and GM-CSF growth factors were higher in SCA patients than healthy donors regardless of any laboratorial and clinical condition. However, high death risk appears to have relevant biomarkers. **Conclusion.** In the SCA pathophysiology at steady state, there is a broad immunological biomarker crosstalk highlighted by TCD4+CD69+ lymphocytes, IL-12 and IL-17 inflammatory and IL-10 regulatory cytokines, MIP-1 α , MIP-1 β , and IP-10 chemokines, and VEGF growth factor. High expression of TLR2 in monocytes and VLA-4 in TCD8+ lymphocytes and high levels of MIP-1 β and RANTES appear to be relevant in high death risk conditions. The high reticulocytosis and high death risk conditions present common correlations, and there seems to be a balance by the Th2 profile.

10.5. Produção científica advinda dos resultados de outros projetos



RESEARCH ARTICLE

Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths

Alexander Leonardo Silva-Junior^{1,2} , Fabíola Silva Alves^{1,2} , Marlon Wendell Athaydes Kerr^{1,2}, Lilyane Amorim Xabregas^{1,2}, Fábio Magalhães Gama^{1,3}, Maria Gabriela Almeida Rodrigues^{4,5}, Alexandre Santos Torres¹, Andréa Monteiro Tarragô^{1,2,3}, Vanderson Souza Sampaio^{4,5,6}, Maria Perpétuo Socorro Sampaio Carvalho^{1,2}, Nelson Abrahim Fraiji^{1,2}, Adriana Malheiro^{1,2,3}, Allyson Guimarães Costa^{1,2,3,4,5*} 



1 Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil, **2** Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil, **3** Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil, **4** Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil, **5** Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Amazonas, Brazil, **6** Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas, Manaus, Brazil

 These authors contributed equally to this work.

* allyson.gui.costa@gmail.com

OPEN ACCESS

Citation: Silva-Junior AL, Alves FS, Kerr MWA, Xabregas LA, Gama FM, Rodrigues MGA, et al. (2019) Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. PLoS ONE 14(8): e0221518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221518>

Editor: Elias Jabbour, M D Anderson Cancer Center, UNITED STATES

Received: March 7, 2019

Accepted: August 8, 2019

Published: August 22, 2019

Copyright: © 2019 Silva-Junior et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Due to ethical restrictions regarding patient privacy, data are available upon request. Data are available upon request from the Ethics Committee of Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM - cephemoam@gmail.com), for researchers who meet the criteria for access to confidential data. Additional requests for the data may be sent to the corresponding author or coauthors Allyson G. Costa (allyson.gui.costa@gmail.com); Adriana Malheiro

Abstract

Introduction

Leukemia is the most common cancer in children and has the highest rates of incidence in industrialized countries, followed by developing countries. This epidemiologic profile can mainly be attributed to the availability of diagnostic resources. In Brazil, leukemia diagnosis is a challenge due to financial viability, lack of hemovigilance services in isolated regions and the vast size of the territory. Its incidence in the state of Amazonas has been increasing since 2010. Therefore, this study aims to describe the epidemiological pattern and spatial distribution of patients with acute lymphoid leukemia and acute myeloid leukemia in Amazonas and identify the predictors of comorbidity and death.

Materials and methods

A retrospective cross-sectional study was carried out based on patients' data which was obtained from the database of a referral center for the period of 2005 to 2015. Variables included age, gender, ethnicity, civil status, schooling, income, location of residence, sub-type of leukemia, comorbidities, and date of death. The spatial distribution was performed using QGIS v.2.18. Stata software was used for univariable and multivariable logistic regression to evaluate the association between both comorbidities and death for all characteristic groups of ALL and AML.

***GSTP1* rs1695 and rs1871042, and *SOD2* rs4880 as molecular markers of lipid peroxidation in blood storage**

Marcelo Reis do Nascimento¹, Rodrigo O. Silva de Souza², Alexander L. Silva Junior⁴, Emerson Silva Lima², Marilda Souza Gonçalves³, José Pereira de Moura Neto¹



¹*Haematology and Haemotherapy Hospital Foundation of Amazonas, Manaus, Amazonas;*

²*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas;*

³*Oswaldo Cruz Foundation - Gonçalo Moniz Research Centre, Salvador, Bahia, Brazil*

Background - Red blood cells (RBC) are subject to oxidative stress by reactive oxygen species (ROS) during storage. Molecular characterisation of oxidative stress in stored RBC, which may also occur in other blood components during long periods of storage, is rare.

Materials and methods - Our study included 45 healthy RBC donors recruited in Brazil. Blood was collected into standard Grifols® Triple Bags containing CPD SAG-M. Haematological values, biochemical data, and oxidative stress markers were assessed weekly during storage until 42 days after collection. *GSTM1* and *GSTT1* were determined by multiplex-polymerase chain reaction (PCR), while *GSTP1* rs1695 and rs1871042, CAT rs1001179, and *SOD2* rs4880 were evaluated by real-time PCR.

Results - A direct proportional relationship was found between storage time and levels of ROS and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS, indicators of lipid peroxidation) ($p < 0.001$). These parameters were indirectly proportional to ABTS values ($p < 0.001$). The plasma concentration of TBARS was associated with *GSTP1* 303^{AG/GG}, *GSTP1* -16^{CT/TT}, and *SOD2* 47^{CT/TT} genotypes. Single-nucleotide polymorphisms at the CAT C-262T gene were not associated with TBARS, nor were oxidative markers of ROS.

Discussion - Prolonged storage may result in the onset of erythrocyte deterioration. Our results clearly indicate that erythrocytes are capable of attenuating ROS for 2 weeks of storage. We observed an association between elevated TBARS levels and the presence of *GSTP1* and *SOD2* variants in stored RBC. Although notable for heterozygous variants, this association was even stronger for the homozygous variants *GSTP1* rs1695 (303^{GG}), *GSTP1* rs1871042 (-16^{TT}), and *SOD2* rs4880 (47^{TT}). These findings accentuate the importance of genetic factors in storage lesions and will expand our understanding and consideration of endogenous and exogenous causes in improving clinical treatment with blood transfusions.

Keywords: *GSTP1*, *SOD2*, lipid peroxidation, blood storage, storage lesions.

INTRODUCTION

Packed red blood cells (RBC) must be stored in optimum conditions in order to preserve their efficacy^{1,2}. Several recent surveys have renewed interest in studies on RBC during refrigerated storage aimed at improving the stability, transfusion efficacy, and safety up to

Arrived: 13 March 2020
Revision accepted: 12 June 2020
Correspondence: José Pereira de Moura Neto
e-mail: jpmn@ufam.edu.br