UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Keli Cristina de Lima

**Níveis séricos de biomarcadores de inflamação, ativação
endotelial e plaquetária e imunomodulação em pacientes
com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades
terapêuticas**

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Níveis séricos de biomarcadores de inflamação, ativação
endotelial e plaquetária e imunomodulação em pacientes
com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades
terapêuticas**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientado(a): Keli Cristina de Lima

Orientador(a): Profa. Dra. Kelen
Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 11/10/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Lima, Keli Cristina

Níveis séricos de biomarcadores de inflamação, ativação endotelial e plaquetária e imunomodulação em pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas. Ribeirão Preto, 2018.

104 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Ribeiro Malmegrim de Farias, Kelen Cristina

1. Doença falciforme; 2.Biomarcadores; 3.Inflamação; 4. Hidroxiuréia; 5. Transfusão Crônica; Transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Keli Cristina de Lima

Níveis séricos de biomarcadores de inflamação, ativação endotelial e plaquetária e imunomodulação em pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador(a): Profa. Dra. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

“Eu te encontrei dentro de mim, não posso mais ser só”.
Ao meu amado esposo, com carinho!

Agradecimentos

Agradeço grandemente a **Deus** por me conceder capacidade e determinação para lutar pelos meus sonhos, coragem para superar cada um dos obstáculos, por me guiar sempre pelos melhores caminhos e por me cercar de pessoas especiais.

À minha orientadora Profa. Dr^a **Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias** por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, por todo apoio e aprendizagem.

Aos meus pais **Felisberto Lima** e **Iracy Lima**, por toda dedicação, incentivo e suporte ao longo da minha vida acadêmica. Às minhas irmãs **Janete Müller** e **Patrícia Ribeiro**, por compreender cada ausência em suas conquistas.

Aos meus sobrinhos **Julia Lima** e **Daniel Müller** por ter me ensinado a ser mãe mesmo sendo tia, por todo o carinho e alegria.

À minha sogra **Cristiane Anhaia**. Aos meus cunhados, **João Otávio Anhaia**, **Marcos Müller** e **Júlio Ribeiro** pelo apoio e a linda família que compomos.

Ao meu querido esposo, **João A. Machado Neto**, por todo o incentivo e por compartilhar comigo todo o seu conhecimento e paixão à pesquisa.

Às minhas amigas **Gisele Pedroso**, **Fernanda Della Via**, **Amanda Maia**, **Janaína Campos** e **Karina Alves** que mesmo a distância estão sempre torcendo por mim.

À minha doce e querida professora de inglês **Carolina Fernandes**, muito obrigada pela amizade e por toda ajuda. Você é incrível!

À **Marjory Donato** minha grande amiga, companheira em todos os momentos, que me acolheu quando precisei e me aguentou por tanto tempo. Você é um presente de Deus!

Ao companheirismo das amigas nascidas no laboratório. À **Marianna Vasconcellos**, **Ana Júlia Sousa**, **Letícia Delfine** e **Nádia Noronha** amigas e companheiras em todos os momentos. À **Juçara Cominal**, minha tão adorável companheira, obrigada por todos os ensinamentos. À **Maira Cacemiro** pela amizade e colaboração.

À **Ana Paula Alves**, **Bruna Fenerich** e **Jaqueline Fernandes** presente nos momentos da diversão.

À **Luciana Jarduli**, muito obrigada pela amizade, pelo apoio irrestrito em todas as etapas deste projeto.

À **Júlia Teixeira**, muito obrigada pela paciência, amizade e pela ajuda nos experimentos. Por todo o suporte ao longo do projeto, pelas correções finais da dissertação e pelo profissionalismo.

Aos demais membros do laboratório pela harmonia na convivência diária. **Rafael Biaggio, Lucas Coelho, Amanda Mizukami, João Rodrigues e Renata Nacasaki.**

Às médicas, **Ana Cristina Pinto, Belinda Simões, Thalita Costa e Maria Carolina Rodrigues** pelas valiosas discussões ao longo de todo projeto, sempre contribuindo com idéias enriquecedoras.

À **equipe de enfermagem** da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto pelo auxílio nas coletas de sangue dos doadores sadios.

Aos **pacientes** com doença falciforme e aos **doadores** sadios, os quais foram imprescindíveis para a realização desse projeto.

À Secretaria da pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial ao **Henrique Theodoro** pela alegria e eficiência no atendimento, por todo o suporte ao longo do curso e a disponibilidade no serviço burocrático.

A todos os alunos e professores do **Grupo de Imunologia (GIPI)**, pela troca de conhecimentos e por toda a capacitação gerada ao longo de nossos encontros.

A todos os funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto. Em especial, **Patrícia Bonine, Camila Menezes, Natália Aydar, Carmem Simão**, por todos os ensinamentos, pela amizade e carinho que sempre tiveram comigo. À **Andréia Silva, Maria Rosa Arcodepani, Josiane Borges**, pela amizade e pelo suporte diário. À **Renata Kurukava**, por toda agilidade e eficiência no serviço burocrático. Ao **Mário Soares**, por nos ajudar no laboratório. Ao **Andy Comming**, pela ajuda nas traduções de inglês dos trabalhos publicados em congressos. À **Fernanda Udinal**, pela ajuda nas correções de português e inglês dos manuscritos publicados. À **Sandra Navarro**, pelas impressões impecáveis dos nossos pôsteres.

Agradeço carinhosamente ao laboratório da Professora **Fátima Sonati**, pelos ensinamentos e pela oportunidade de adquirir experiência em seu laboratório. Aos seus excelentes funcionários em especial à **Elza Kimura, Gisele Pedroso** e meus antigos colegas de laboratório, pelos incentivos constantes na minha formação como pesquisadora.

Agradeço ao laboratório da professora **Fabiani Gai e Lúcia Faccioli** pela colaboração, por terem apoiado este projeto e disponibilidade de seu laboratório.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo apoio financeiro.

Conhecimento serve para encantar as pessoas, não para humilhá-las!
(Mário Sérgio Cortella)

RESUMO

LIMA, K. C. **Níveis séricos de biomarcadores de inflamação, ativação endotelial e plaquetária e imunomodulação em pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas.** 2018. 100f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A doença falciforme constitui um grupo de hemoglobinopatias hereditárias caracterizadas por uma mutação de ponto na cadeia da globina β , que resulta em uma hemoglobina anormal denominada HbS. Apesar de sua importância para a saúde pública mundial e seu grande impacto social, a doença falciforme ainda apresenta muitas questões fisiopatológicas não esclarecidas e desafios terapêuticos. Paralelamente, existe a necessidade da descoberta de novos biomarcadores fisiopatológicos da doença falciforme e de biomarcadores de resposta terapêutica. O objetivo desse trabalho foi quantificar, em amostras de soro de indivíduos saudáveis (N=19) e de pacientes com doença falciforme sem tratamento (N=14) ou tratados com hidroxiuréia (N=15), transfusão crônica (N=15) ou transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas (N=21), biomarcadores de ativação endotelial (VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, P-selectina, HGF, FGF, VEGF-A, endotelina-1, CXCL4/PF4, TGF- β e óxido nítrico), biomarcadores de ativação plaquetária (von Willebrand e trombosmodulina), biomarcadores de inflamação (IL-1 β , pentaxina-3, IL-18, IL-6, IL-8, IL-2, IL-17A, TNF- α , INF- γ , CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β , IL-12p70, IL-33, IL-27, GM-CSF, CD163, osteopontina, BAFF, APRIL e heme) e biomarcadores relacionados à imunomodulação (arginase-1 e IL-10). De acordo com os resultados obtidos e as análises de correlação, os pacientes com doença falciforme sem tratamento, tratados com transfusão crônica ou transplante apresentaram perfis mais inflamatórios que os pacientes tratados com hidroxiuréia. Os tratamentos com transfusão crônica e transplante não foram capazes de diminuir os níveis séricos dos biomarcadores de inflamação, de ativação endotelial e plaquetária para níveis similares aos dos indivíduos saudáveis. Os pacientes tratados com transfusão crônica apresentaram o perfil mais inflamatório de todos os grupos analisados. Apesar dos pacientes tratados com hidroxiuréia apresentarem os menores níveis séricos de biomarcadores de inflamação e de ativação endotelial e plaquetária, estes continuaram apresentando níveis séricos elevados de heme e da citocina pró-inflamatória IL-18. Os pacientes transplantados apresentaram perfil inflamatório intenso, com níveis elevados de P-selectina, trombosmodulina e IL-8 (relacionados à ativação endotelial, ativação plaquetária e inflamação, respectivamente) em comparação com todos os grupos analisados. Porém, os pacientes transplantados apresentaram níveis séricos de IL-18 significativamente menores que os pacientes com doença falciforme sem tratamento. Os pacientes transplantados apresentaram níveis séricos da citocina anti-inflamatória IL-10 similares aos de indivíduos saudáveis, porém, significativamente maiores que os pacientes tratados com hidroxiuréia. Os resultados obtidos nesse trabalho podem direcionar estudos futuros para o monitoramento laboratorial de respostas terapêuticas aos diferentes tratamentos atualmente utilizados para doença falciforme e para o desenvolvimento de novos tratamentos ou de terapias complementares às que estão atualmente disponíveis.

Palavras-chave: doença falciforme, biomarcadores, inflamação, hidroxiuréia, transfusão crônica, transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas.

ABSTRACT

LIMA, K. C. Serum levels of biomarkers of inflammation, endothelial and platelet activation and immunomodulation in patients with sickle cell disease submitted to different therapeutic modalities. 2018. 100f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Sickle cell disease is a group of hereditary hemoglobinopathies characterized by a point mutation in the β globin chain, which results in an abnormal hemoglobin named HbS. Despite its importance for global public health and its great social impact, sickle cell disease still presents many unclarified pathophysiological issues and therapeutic challenges. In parallel, there is a need for the discovery of new pathophysiological biomarkers of sickle diseases and biomarkers of therapeutic response. The aim of this study was to quantify serum samples from healthy subjects (N = 19) and patients with sickle cell disease (N = 14) or treated with hydroxyurea (N = 15), chronic transfusion (N = 15) or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (N = 21) endothelial activation biomarkers (VCAM-1, ICAM-1, E-selectin, P-selectin, HGF, FGF, VEGF-A, endothelin-1, CXCL4 / PF4, TGF- β and nitric oxide), platelet activation biomarkers (von Willebrand and thrombomodulin), inflammatory biomarkers (IL-1 β , pentraxin-3, IL-18, IL-6, IL-8, IL-2, IL-17A, TNF- α , INF- γ , CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β , IL-12p70, IL-33, IL-27, GM-CSF, CD163, osteopontin, BAFF, APRIL and heme) and immunomodulatory biomarkers (arginase-1 and IL-10). According to the obtained results and correlation analyzes, patients with sickle disease without treatment, treated with chronic transfusion or transplantation presented more high inflammatory profiles than patients treated with hydroxyurea. Patients treated with chronic transfusion and transplantation were not able to decrease the elevated serum biomarkers of inflammation and endothelial and platelet activation similar to healthy subjects levels. Patients treated with chronic transfusion presented the most inflammatory profile of all groups analyzed. Although patients treated with hydroxyurea had the lowest serum levels of inflammatory and endothelial/platelet activation biomarkers, they continued to have high serum levels of heme and proinflammatory cytokine IL-18. Transplanted patients presented a high inflammatory profile, with elevated levels of P-selectin, thrombomodulin and IL-8 (related to endothelial activation, platelet activation and inflammation, respectively) compared to all groups analyzed. However, transplant patients had significantly lower serum IL-18 levels than patients with untreated sickle cell disease. Notably, transplanted patients had levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 similar to those of healthy subjects, but significantly higher than patients treated with hydroxyurea. The results obtained in this study may pave the way for future studies for the laboratory monitoring of therapeutic responses to different sickle cell disease treatments and for the development of new or complementary treatments to the currently available therapies.

Keywords: sickle cell disease, biomarkers, inflammation, hydroxyurea, chronic transfusion, hematopoietic stem cell allogeneic transplantation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração das alterações moleculares e celulares induzida pela hemoglobina S (HbS).....	19
Figura 2. Interface entre o estado inflamatório crônico e a ocorrência de vaso-occlusão na doença falciforme.....	23
Figura 3. Contribuição da hemólise para os processos vaso-oclusivos e propagação da inflamação.....	25
Figura 4. Principais fatos históricos desde a descoberta até a aplicação clínica da hidroxiuréia na doença falciforme.....	30
Figura 5. Modelo de inclusão e divisão dos indivíduos sadios e pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas	39
Figura 6. Níveis séricos de biomarcadores de ativação endotelial em indivíduos sadios e pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 7. Níveis séricos de biomarcadores de ativação plaquetária em indivíduos sadios e pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 8. Níveis séricos de biomarcadores de inflamação (citocinas) em indivíduos sadios e pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 9. Níveis séricos de biomarcadores de inflamação (quimicinas/fatores de crescimento e outros) em indivíduos sadios e pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 10. Níveis séricos de biomarcadores imunomoduladores em indivíduos sadios e pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 11. Interações sistêmicas entre os biomarcadores avaliados em indivíduos sadios e pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 12. Perfil inflamatório e imunológico em indivíduos sadios e pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas.	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com doença falciforme incluídos no estudo.....38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APRIL – do inglês “*proliferation-inducing ligand*” ou ligante indutor de proliferação
- ATG – globulina antitimocítica
- AVC – acidente vascular cerebral
- BAFF – do inglês “*B-cell activating fator*” ou fator ativador de células B
- BU – bussulfano
- CCL – do inglês “*C-C- motif chemokine ligand*”
- CD – do inglês “clusters of differentiation”
- CEP – comitê de ética em pesquisa
- CY – ciclofosfamida
- CXCL – do inglês “*C-X-C motif chemokine ligand*”
- ET – endotelina
- DECH – doença do enxerto contra o hospedeiro
- DF – doença falciforme
- EMA – do Inglês “*European Medicines Agency*” ou Agência de Medicina Européia
- FDA – do inglês “*Food and Drug Administration*”
- Fe – ferro
- vWF – fator de von Willebrand
- Glu – ácido glutâmico
- GM-CSF – do inglês “*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*” ou fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
- Hb – hemoglobina
- HGF – do inglês “*hepatocyte growth fator*” ou fator de crescimento de hepatócitos
- HLA – do inglês “*human leukocyte antigen*” ou antígeno leucocitário humano
- HU – hidroxirúria
- ICAM-1 – do inglês “*intercellular adhesion molecule-1*” ou molécula de adesão intracelular-1
- IFN- γ – do inglês “*gamma interferon*” ou interferon gama
- IL – interleucina
- ILT – irradiação linfonodal total
- LDL – do inglês “*Low-density lipoprotein*” ou lipoproteína de baixa densidade
- MCP-1 – do inglês “*monocyte chemoattractant protein-1*” ou proteína quimioatraente de monócitos-1

MHC – do inglês “*major histocompatibility complex*” ou complexo principal de histocompatibilidade

MIP-1 α – “*macrophage inflammatory protein-1 alpha*” ou proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa

MIP-1 β – do inglês “*macrophage inflammatory protein-1 beta*” ou proteína inflamatória de macrófagos 1 beta

NF κ B – fator Nuclear- κ B

NK – do inglês “*natural killers*” ou matadoras naturais

NLRP – do inglês “*NLR family pyrin domain containing 3*”

OPN – osteopontina

PGE – prostaglandinas

PSGL-1 – do inglês “*P-selectin glycoprotein ligand*”

P-SL – P-selectina

PTX-3 – pentraxina-3

mRNA – do inglês “*Messenger RNA*” ou RNA mensageiro

SUS – sistema único de saúde

TCTH – transplante de células-tronco hematopoéticas

TCTHa – transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico

TGF- β – do inglês “*transforming growth factor beta*” ou fator de crescimento transformador beta

Th – do inglês “*T helper cells*” ou células T helper

TLR – do inglês “*Toll-like receptor*” ou receptor do tipo toll

TM – trombomodulina

TNF- α – do inglês “*tumor necrosis factor alpha*” ou fator de necrose tumoral alfa

TNF- β – do inglês “*tumor necrosis factor beta*” ou fator de necrose tumoral beta

VAL – valina

VLA-4 – do inglês “*Very Late Antigen-4*”

VCAM-1 – do inglês “*vascular-cell adhesion molecule 1*” ou molécula de adesão vascular 1

VEGF-A – do inglês “*vascular endothelial growth factor-A*” ou fator-A de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Etiologia e base molecular da doença falciforme.....	17
1.2. Principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na doença falciforme	20
1.3. Principais modalidades terapêuticas para doença falciforme	27
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	33
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo geral.....	35
3.2. Objetivos específicos	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1. Casuística	36
4.2. Quantificação de heme sérico	39
4.3. Quantificação de óxido nítrico sérico	40
4.4. Quantificação de biomarcadores séricos pela metodologia ELISA.....	40
4.5. Quantificação de biomarcadores séricos pela metodologia multiplex.....	41
4.6. Análise estatística	42
5. RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
5.1. Quantificação de biomarcadores séricos de ativação endotelial em pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas.	Erro! Indicador não definido.
5.2. Quantificação de biomarcadores séricos de ativação plaquetária em pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas.	Erro! Indicador não definido.
5.3. Quantificação de biomarcadores séricos relacionados com inflamação em pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas.	Erro! Indicador não definido.

5.4. Quantificação de biomarcadores séricos relacionados à imunomodulação em pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes abordagens terapêuticas.	Erro! Indicador não definido.
5.5. Redes de correlação entre biomarcadores no grupo de indivíduos sadios e de pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes abordagens terapêuticas.	Erro! Indicador não definido.
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICE(S)	Erro! Indicador não definido.
ANEXO(S)	Erro! Indicador não definido.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Etiologia e base molecular da doença falciforme

A doença falciforme constitui um grupo de hemoglobinopatias hereditárias caracterizadas por uma mutação de ponto na cadeia da globina β , que resulta em uma hemoglobina (Hb) anormal denominada HbS^{1,2}. Em homozigose (HbSS), a HbS dá origem a anemia falciforme. Em heterozigose, a HbS pode interagir com outras hemoglobinas, bem como a HbC, a HbD, HbE e com as talassemias (β^0 e β^+)³, resultando em outras formas da doença, denominadas de doença falciforme. Estas, conjuntamente, encontram-se entre as doenças hereditárias mais comuns do mundo⁴. Os haplótipos do cluster da globina β são produzidos por diferentes mecanismos de recombinação e o determinante genético presente no complexo do gene da cadeia β possivelmente afetam a expressão dos genes γ . Assim, a gravidade e manifestações clínicas da doença falciforme dependem da variabilidade genética do paciente e são profundamente heterogêneas^{3,5}. Diferentes moduladores genéticos já foram identificados e associados com o aumento da incidência de complicações clínicas na doença falciforme⁶, como por exemplo, os estudos voltados para reguladores da HbF que são considerados os maiores modeladores genéticos na doença falciforme, uma vez que a presença da HbF reduz a polimerização da desoxiHbS e suas consequências fisiopatológicas⁷.

A doença falciforme tem origem do continente africano, difundiram-se para Península Arábica, sul da Itália e Índia posteriormente trazida às Américas por cerca 3-4 milhões de trabalhadores escravos⁸. Estima-se que aproximadamente 7% da população mundial possui a mutação da HbS e que anualmente nascem por volta de 300.000-400.000 crianças com doença falciforme⁵. No Brasil, a distribuição do gene é heterogênea, dependendo de composição negróide ou caucasóide que compromete 4% da população⁹, sendo que o nordeste possui a maior frequência devido a proporção de antepassados negros da população ter sido também maior⁸. Segundo o Programa Nacional de Triagem Neonatal, nascem em torno de 3.500 crianças ao ano com doença falciforme sendo que 200.000 são ao menos portadoras do traço falciforme^{10,11}.

A etiologia da doença falciforme ainda é tema de muitas pesquisas, sabe-se que é mais prevalente em indivíduos de raça negra, com maior incidência na

África^{12,13}. Estudos bem estabelecidos demonstraram que a mutação (GAG→GTG) no gene da globina β confere proteção aos eritrócitos contra a infecção desenvolvida pelo protozoário do gênero *Plasmodium* que causa a malária¹⁴. Há evidências de que os indivíduos portadores do traço falciforme são resistentes aos graves episódios de malária, assim a mutação (GAG→GTG) torna-se relevante pelo fato de que os sintomas da malária são amenizados e sem evolução de morte, ou seja, os indivíduos que possui o gene modificado para a mutação apresentam vantagem seletiva em relação àqueles indivíduos que não tem a mutação¹⁵.

Dentre as manifestações clínica da doença falciforme, a anemia falciforme corresponde a uma das formas mais agressivas da doença, na qual uma grande porção dos pacientes pode vir a óbito ainda nos primeiros anos de vida na ausência de diagnóstico precoce e de tratamento. Já, os indivíduos heterozigotos para HbS (traço falciforme) em sua maioria, não necessitam de tratamento e têm expectativa de vida normal¹³.

A doença falciforme foi relatada pela primeira vez em 1910 por James B. Herrick, médico cardiologista de Chicago, o qual aplicou o termo “formato de foice” para descrever “a forma alongada do corpúsculo de sangue observada através de uma fotomicrografia presente no sangue do seu paciente de cor negra”¹⁶. Até o ano de 1945, não havia hipóteses que a doença poderia ser gerada por anormalidades na molécula de hemoglobina. Em 1949, Pauling e colaboradores descreveram que a doença falciforme é uma doença molecular, vista por uma diferença na velocidade de migração das moléculas de hemoglobina HbS e da hemoglobina normal (HbA), sendo esta a primeira doença monogenética a ser caracterizada de forma molecular^{17,18}. Nesse mesmo ano, Nell e colaboradores, comprovaram experimentalmente que a doença falciforme era uma doença hereditária autossômica recessiva¹⁹. Em 1957, Ingram e colaboradores, através das análises de mutações da hemoglobina humana, demonstraram que a doença falciforme consiste de uma mutação de ponto (GAG→GTG) no sétimo códon (quando contabilizado o códon que codifica a metionina de iniciação)^{20,21} do gene que codifica a globina β , que está localizado no cromossomo 11, promovendo a troca de um resíduo de ácido glutâmico por um resíduo de valina na cadeia polipeptídica β da hemoglobina²².

A hemoglobina S (HbS) é uma molécula solúvel no citoplasma dos eritrócitos exclusivamente na presença de oxigênio. Na ausência de oxigênio, as moléculas HbS tornam-se insolúveis e sofrem polimerização¹⁷. As moléculas de HbS

dexoxigenadas ligam-se uma as outras a fim de esconder regiões hidrofóbicas da proteína, o que culmina na formação/nucleação de polímeros de HbS²³. A formação de longos filamentos promovidos pela polimerização da HbS modifica as células vermelhas dando-lhes o aspecto de “forma de foice” (daí o nome células falciformes) e nesta condição elas apresentam uma capacidade reduzida para realizar o transporte de oxigênio. Este processo é reversível, no entanto, ciclos repetidos de polimerização propiciam danos na arquitetura dos eritrócitos, promovendo à diminuição da flexibilidade, a desidratação, a deformação e por fim a falcização permanente^{24,25} (**Figura 1**).

As alterações ocorridas na estrutura dos eritrócitos podem promover a oclusão de vasos sanguíneos, aumento da viscosidade sanguínea e inflamação¹⁷. Além das alterações morfológicas e funcionais, as células falciformes apresentam menor sobrevida e promovem manifestações clínicas complexas nos pacientes portadores dessa doença^{17,26}. As principais manifestações clínicas são anemias hemolítica, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar, osteonecrose, insuficiência renal, úlceras de perna, acidente vascular cerebral, retinopatia, doenças cardíacas e priapismo^{26,27}.

Figura 1. Ilustração das alterações moleculares e celulares induzida pela hemoglobina S (HbS).

A substituição de um nucleotídeo A por T na 17ª posição (sétimo códon) do gene da globina beta resulta na troca de resíduo do ácido glutâmico (Glu) por uma valina (Val) na posição 6 da proteína. Essa alteração molecular proporciona a capacidade de polimerização para a HbS (nome dado a hemoglobina formada a partir da globina beta mutante). Os polímeros de HbS, por sua vez, resultam na deformação no eritrócito, deformando-o, e por vezes deixando-o com aspecto de “foice” (fato que resultou no termo “falciforme”). Essa alteração reduz o tempo de sobrevida do eritrócito e contribui para as diversas alterações fisiopatológicas presente na doença falciforme. Adaptado de Kato *et al.* 2018²⁵.

A fisiopatologia da doença falciforme é complexa e multissistêmica. Além dos diversos quadros clínicos já citados anteriormente, estudos recentes demonstram que a diversidade de condições climáticas, sociais, econômicas, nutricionais e educacionais, bem como o acesso ao tratamento clínico contribuem para a diversidade clínica desses pacientes²⁸.

1.2. Principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na doença falciforme

A vaso-occlusão é a causa importante de morbimortalidade nos pacientes com doença falciforme e resulta de múltiplas etapas e uma complexa interação entre diferentes tipos celulares (eritrócitos, leucócitos, células endoteliais, plaquetas)²⁹ e ativação/produção de diversas moléculas (fatores de coagulação, moléculas de adesão solúveis, moléculas decorrentes da hemólise)^{24,25}. Esse evento ocorre principalmente na microcirculação (medula óssea, pulmões e rins), embora algumas complicações como o acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi) envolve vasos com grande calibre³⁰. Como consequência, a hipóxia decorrente da obstrução vascular leva aos infartos teciduais e proporciona crises de dor ou danos teciduais crônicos^{30,31}.

Recentemente, Conran e colaboradores²⁴ (2009) descreveram que cada tipo celular fornece contribuições específicas no processo de vaso-occlusão.

Os eritrócitos têm receptores ligados à membrana celular que podem interagir com moléculas de adesão, assim, as células falciformes apresentam uma grande facilidade em se ligar às moléculas de adesão^{32,33}, tais como integrina $\alpha 4b1$ (VLA-4), ICAM-1 e VCAM-1. Esta interação é capaz de intermediar os eventos de sinalização intracelular que promovem uma alta propriedade de adesão celular no endotélio. Neste processo participam também uma grande quantidade de reticulócitos mais jovens, que apresentam expressão de CD36, bem como subunidades de integrina VLA-4 (CD49d e CD29)²⁴. Além das alterações nas moléculas de adesão, alguns estudos apontam que as cargas superficiais anormais na membrana de células falciformes poderiam estar relacionadas ao aumento de adesão das mesmas ao endotélio³⁴. Outros ligantes moleculares participam deste processo de forma indireta, como as imunoglobulinas, a trombospondina e o fator de von Willebrand (vWF)²⁴.

Os leucócitos em sua forma ativa também desempenham papel significativo na oclusão vascular e no processo inflamatório crônico. O processo é desencadeado por meio da adesão ao endotélio vascular, especialmente na presença de estímulo inflamatório. Os leucócitos apresentam dimensões maiores que as hemácias, pouco deformáveis e são reativamente mais rígidas à parede da microvasculatura podendo aderir facilmente ao endotélio ativado e mediar a adesão de eritrócitos circulantes à parede vascular¹³. Essas células aderem ao endotélio ativado através de um processo sequencial, que envolve selectinas, integrinas e interação com células falcizadas. O processo pode propiciar o bloqueio do fluxo sanguíneo da microvasculatura, reduzir o fluxo sanguíneo dos vasos e reter as células falciformes, resultando em agregação heterotípica e consequentemente a vaso-oclusão³⁵.

Os repetidos episódios de vaso-oclusão podem culminar em uma cascata de condições debilitantes, como inflamação, isquemia-reperfusão, lesões crônicas e crises dolorosas³⁶. Os diversos danos sofridos na membrana durante os ciclos de falcização das hemácias, resultam na liberação de proteínas imunogênicas e na produção de espécies reativas de oxigênio¹³ (**Figura 2**).

Os mecanismos pelos quais as plaquetas participam dos processos de vaso-oclusão são menos elucidados^{37,38}. Acredita-se que as plaquetas apresentem propriedades adesivas aumentadas em pacientes com doença falciforme, por mecanismos que envolvem ativação intracelular, liberação de mediadores solúveis, alterações morfológicas e modificações da propriedade da membrana plasmática³⁹. Uma vez ativadas, as plaquetas são capazes de liberar muitas substâncias de seus grânulos, incluindo moléculas pró- e anti-inflamatórias, como por exemplo IL-1 β , CD40 ligante (CD40L) e IL-6^{40,41}. A adesão de plaquetas ativadas aos leucócitos através da P-selectina e PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), nos locais de inflamação ou lesões teciduais, também pode contribuir ainda mais para inflamação do endotélio vascular⁴².

O endotélio vascular tem um papel central no processo de inflamação crônica e fenômeno de vaso-oclusão. As lesões endoteliais promovidas pela adesão de células falcizadas juntamente com a hemólise, ativam as células endoteliais a expressarem alguns mediadores tais como endotelina-1 (potente vasoconstritor e agonista pró-inflamatório)⁴³ e o fator de transcrição NF κ B (*Nuclear fator kappa B*; participa do controle da expressão de uma ampla variedade de genes envolvidos nas respostas inflamatórias e imunológicas)^{44,45}. Com a ativação anormal dos fatores

de transcrição da família NFκB em vasos inflamados, há uma elevação na produção de TNF-α, GM-CSF, citocinas (IL-1β, IL-8, IL6), mediadores inflamatórios como prostaglandinas 1 e 2 (PGE₁ e PGE₂), além do aumento da expressão das moléculas de adesão como selectinas, VCAM-1 e ICAM-1⁴⁶⁻⁴⁹.

O estado inflamatório crônico na doença falciforme é caracterizado pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, mediadores lipídicos e do número de células mononucleares (principalmente monócitos, linfócitos T e linfócitos B) circulantes^{24,50,51,52} (**Figura 2**). Pacientes com doença falciforme em períodos de crises ou de estabilidade, apresentam elevada concentração plasmática de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, tais como TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1α, VEGF o que correlaciona com a severidade da manifestação da doença⁵³.

De fato, ao longo dos últimos anos, diversos estudos têm buscado a identificação de biomarcadores para resposta terapêutica, complicações da doença e para explicar a heterogeneidade clínica encontrada nos pacientes com doença falciforme. Dentre estes, destaca-se o estudo conduzido por Lanaro *et al.*⁵⁴ (2009) que reportaram que o tratamento com hidroxiuréia é capaz de modular mediadores inflamatórios, imunomoduladores a níveis gênicos (mRNA) e séricos. Outros estudos, com foco nas complicações clínicas, comparam os níveis de diversos biomarcadores de ativação de inflamação, fatores de crescimento e coagulação no qual observaram diferenças entre pacientes com doença falciforme em estado estável e durante as crises de dor^{53,55,56}. Em pacientes com doença falciforme que apresentaram úlceras de pernas, Silva *et al.*⁵⁷ observaram que um perfil Th17 apresenta um potencial efeito protetor para síndrome torácica aguda em pacientes com doença falciforme. De forma similar, a expressão de biomarcadores, como IL-10, IL-18 e VCAM-1, têm sido correlacionadas com catabólitos ou produtos provenientes de inflamassoma (ácido úrico) e hemólise (LDL), sugerindo que a distribuição da expressão desses biomarcadores se correlacionam com os processos/fenótipos investigados e que refletem na diversidade clínica observada⁵⁸.

Figura 2. Interface entre o estado inflamatório crônico e a ocorrência de vaso-oclusão na doença falciforme.

Os ciclos de falcização e desfalcização dos eritrócitos falciformes resultam na exposição de glicolípídeos e proteínas na superfície celular. A adesão dos eritrócitos e leucócitos ao endotélio, pode causar lesão endotelial e ativar os eventos que culminam na cascata de coagulação. Entre os eventos moleculares envolvidos estão a ativação de NFkB e a produção de endotelina-1 (ET-1). As interações entre o endotélio ativado, eritrócitos, leucócitos e plaquetas induzem uma ativação pancelar e a produção de múltiplos mediadores inflamatórios. A perpetuação desse processo gera um estado inflamatório crônico e desempenha um papel fundamental no processo de vaso-oclusão. Adaptado de Conran *et al*, 2009²⁴.

A hemólise intravascular é uma das principais características presente em pacientes com doença falciforme que cursam com anemia hemolítica grave. Dentre os elementos liberados pelas hemácias durante a lise, destaca-se o heme, um componente da hemoglobina composto por um anel tetra-pirrólico com um átomo de ferro (Fe) ligado ao centro⁵⁹. Do ponto de vista imunológico, o heme apresenta funções significativas, uma vez que essa molécula é capaz de ser reconhecida pelo TLR4 e ativar as vias de sinalização relacionadas⁶⁰ (**Figura 3**). O TLR4 é um receptor celular, que dentre outras funções, participa da imunidade inata e medeia a produção de diversas citocinas inflamatórias⁶¹. Utilizando modelos animais com doença falciforme, Ghosh *et al.*⁶² e Belcher *et al.*⁶³ demonstraram que o heme extracelular, através de um mecanismo dependente de TLR4, é capaz de causar duas complicações graves na doença falciforme: a crise torácica aguda e a vaso-oclusão. Outro estudo mostrou que as moléculas de heme são capazes de agir

como um indutor de maturação e secreção de IL-1 β através da ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos⁶⁴.

Devido sua natureza anfipática, o heme livre pode atuar nas membranas celulares, bem como em organelas, produzindo efeitos potencialmente prejudiciais devido a seus efeitos pró-oxidante, citotóxico e inflamatório^{65,66}.

A presença de hemoglobinas livres na circulação decorrente da hemólise intracelular diminui a disponibilidade de óxido nítrico e do tônus vascular, tendo como consequência a vasoconstrição, processos oxidativos e inflamatórios³⁶ (**Figura 3**). As moléculas de óxido nítrico são sintetizadas por células endoteliais e atuam como um importante vasodilatador. Assim que é liberado pelo endotélio, através de vias específicas, o óxido nítrico medeia diversas funções celulares, incluindo aumento do fluxo sanguíneo, a inibição da agregação plaquetária, inibição da expressão das moléculas de adesão e ativação leucocitária, bem como atua em estímulos a favor da expressão da hemoglobina fetal (HbF)^{12,62,67}. Além da interação com hemoglobinas livres, o óxido nítrico também pode reagir com outros radicais, como por exemplo, o superóxido O₂⁻, levando à redução de sua biodisponibilidade. Atualmente é proposto que a deficiência de óxido nítrico participe de vasculopatias e na desregulação da hemostasia^{36,45,68}.

Figura 3. Contribuição da hemólise para os processos vaso-oclusivos e propagação da inflamação.

A hemólise intravascular é caracterizada pelo processo do rompimento da hemácia e a liberação de seu conteúdo na circulação. Esse evento ocorre devido à fragilização das hemácias após múltiplos ciclos de falcização. A hemoglobina plasmática reage com óxido nítrico presente na circulação para a formação da metemoglobina plasmática e ferro-nitrosil-hemoglobina plasmática e reduz substancialmente a capacidade do plasma de consumir o óxido nítrico. A hemoglobina ferrosa isenta de células (vermelha) consome o óxido nítrico produzido pelas células endoteliais, desviando-as das células do músculo liso. Os principais produtos dessa reação são metemoglobina (ilustrada na cor marrom) e nitrato; a nitrosil-hemoglobina de ferro é formada como um produto menor, assim, o óxido nítrico produzido endogenamente é livre para se difundir para o músculo liso e regular o tônus vascular e regular a expressão da molécula de adesão. A hemoglobina oxidada libera heme livre. O heme pode servir como um intensificador do processo patológico na doença falciforme, devido promover o estímulo do sistema imune inato a elevações agudas em ligantes endógenos e exógenos de TLR4. Estes, por sua vez, ativam a produção de citocinas inflamatórias e outros mediadores que promovem a expressão de receptores de adesão e ligantes no endotélio e nas células sanguíneas. Todos esses processos contribuem para a vaso-oclusão e propagação da inflamação. Adaptado de Reiter *et al.*⁶⁹ e Kato *et al.* 2018²⁵

Pacientes com doença falciforme sofrem diversos ciclos de falcização que causam dores intensas e disfunção inflamatória/imunológica que pode causar maior suscetibilidade a infecções, agravando sobremaneira o quadro clínico e a qualidade de vida desses pacientes. A disfunção inflamatória/imunológica crônica pode

desencadear o desenvolvimento de doenças autoimunes concomitantes nos pacientes com doença falciforme⁷⁰.

As principais infecções na infância são causadas por *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) e o *H. Influenzae*^{71,72}. Em adultos e em crianças acima dos cinco anos de idade são mais comuns infecções por bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Salmonella*⁷³. Os pacientes com doença falciforme que apresentam perda da função esplênica ou esplenectomizados apresentam maior disfunção do sistema imune inato, prejudicando a eliminação de bactérias encapsuladas⁷⁴.

Disfunções do sistema imune adaptativo em pacientes com doença falciforme também tem sido descritas na literatura nos últimos anos^{53,75}. Nickle *et al.*⁷⁶ (2015) avaliaram a influência dos tratamentos com hidróxiuréia e transfusão crônica no perfil imunológico de pacientes com doença falciforme e observaram que o número absoluto da maioria das populações celulares analisadas (células NK, linfócitos T e B, linfócitos T CD4+ e CD8+ *naïve* e de memória, células Tregs) estava aumentado no grupo tratado com transfusão crônica em relação ao grupo tratado com hidroxiuréia e ao grupo de indivíduos saudáveis, sendo que o perfil imunológico dos pacientes tratados com hidroxiuréia foi o mais próximo do perfil do grupo dos indivíduos saudáveis⁷⁶. Além disso, os autores mostraram que o tratamento com hidroxiuréia aumenta os linfócitos T CD4+ e a expressão de Ki67, bem como melhora o status imunológico dos pacientes em relação aos pacientes tratados com transfusão crônica.

Raghupathy e colaboradores (2000)⁷⁷ mostraram níveis plasmáticos elevados de IL-4 (citocina de perfil Th2) em 39 pacientes com doença falciforme, em comparação com indivíduos saudáveis. No entanto, em pacientes com função esplênica preservada, o perfil de citocinas Th1 foi predominante, o que pode explicar a maior resistência desses pacientes a infecções bacterianas.

Devido ao fato da aloimunização causada pelas transfusões sanguíneas ser uma complicação relevante para a doença falciforme, muitos estudos buscam entender os componentes imunológicos que participam deste processo. Bao *et al.*⁷⁸ mostraram uma redução de células T reguladoras e níveis séricos de IL-10, e aumento de repostas Th2 em pacientes aloimunizados.

Em outro estudo, o mesmo grupo de pesquisa observou que células B reguladoras de pacientes com doença falciforme aloimunizados apresentam

capacidade reduzida de suprimir a ativação imunológica, uma vez que as células B desses pacientes expressam níveis reduzidos de IL-10 e menor capacidade de inibir a expressão de TNF- α em monócitos autólogos quando comparado com pacientes não-aloiimunizados⁷⁹. Em contraste, Vingert *et al.*⁸⁰ apesar de demonstrarem uma disfunção nas células T reguladoras em pacientes com doença falciforme em relação aos indivíduos saudáveis, não observaram diferenças entre o fenótipo e função supressora *in vitro* de células T reguladoras provenientes de pacientes que apresentaram respostas fortes e fracas à aloimunização. Alterações na função de células dendríticas de pacientes com doença falciforme aloimunizados também já foram descritas⁸¹.

O tratamento com hidroxiuréia de crianças com doença falciforme reduziu o número de células T CD4⁺ de memória em comparação com grupo de pacientes que recebeu placebo, mas os valores ainda se encontram no intervalo para crianças saudáveis da mesma idade. Como consequência, a resposta a determinadas vacinas são mais lentas, entretanto, sem prejuízos para a eficácia final⁸².

1.3. Principais modalidades terapêuticas para doença falciforme

Diversas intervenções terapêuticas têm sido aplicadas para melhorar os sintomas clínicos dos pacientes com doença falciforme. Devido aos grandes avanços no conhecimento da fisiopatologia e do curso da história natural da doença, os resultados clínicos têm sido promissores com a melhora da qualidade de vida dos pacientes.

Os programas de triagem neonatal, introduzidos em alguns países, inclusive no Brasil, propiciam um diagnóstico precoce, a fim de tomar medidas preventivas como a introdução da hidroxiuréia, transfusão crônica, a imunização com a vacina pneumocócica conjugada, o uso profilático de penicilina durante a infância e a introdução do doppler transcraniano⁸³⁻⁸⁵. Ainda neste contexto, vale a pena ressaltar que a Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea incorporou recentemente a doença falciforme na lista de doenças que possuem indicação do transplante alogênico de células tronco-hematopoéticas (TCTH), sendo esta a única modalidade terapêutica curativa para os portadores de doença falciforme^{10,86}.

As principais formas de terapias utilizadas e desenvolvidas para a doença falciforme visam três pontos fundamentais (i) a diminuição da polimerização da HbS

nas células falciformes a partir de agentes capazes de ativar a síntese de HbF, (ii) a redução da adesão celular e redução dos eventos de vaso-oclusão (iii) a modulação/diminuição dos processos inflamatórios e do estresse oxidativo. Devido aos diferentes moduladores genéticos nem todos os indivíduos portadores de doença falciforme costumam responder de forma positiva aos tratamentos disponíveis, contudo, essas estratégias são capazes de melhorar o curso da doença, e consequentemente a qualidade de vida.

Dentre os fármacos utilizados para o tratamento das doenças falciformes, a hidroxiuréia ou hidroxycabamida, é a mais utilizada. Essa droga foi sintetizada em 1869, na Alemanha, desde então tem sido alvo de interesse científico. Em 1928, teve seu potencial biológico reconhecido como um composto simples da fórmula, $\text{H}_2\text{NCONHOH}$, cuja fração C-NHOH é responsável por toda a atividade biológica^{87,88,89}. A hidroxiuréia possui um radical que impede a síntese da enzima ribonucleotídeo redutase durante a fase G1/S do ciclo celular. Possui ações anti-mitótica e citotóxica quando utilizada em concentrações elevadas por um longo período de tempo.

A facilidade de administração e o baixo custo para os programas governamentais fazem com que essa droga seja vista com múltiplos benefícios de ordem clínica para os pacientes com doença falciforme⁸⁸. Nos anos de 1950, foi demonstrado em modelos experimentais que a hidroxiuréia possui ampla atividade antitumoral contra tumores sólidos e neoplasias hematológicas. Na década de 1960 foram realizados os primeiros ensaios clínicos em pacientes com neoplasias mieloproliferativas, demonstrando uma ação citotóxica/citoreduzora com poucos efeitos colaterais^{89,90}.

A descoberta do potencial clínico da hidroxiuréia para pacientes com doença falciforme ocorreu em 1984 através da observação da produção de hemoglobina fetal em eritrócitos falciformes dos pacientes tratados^{89,91}. O fármaco promove mudanças na cinética da proliferação das hemácias facilitando a síntese de HbF por eritroblastos primitivos e de divisão lenta, reduzindo a produção de eritrócitos ricos em HbS que se originam a partir dos eritroblastos de rápida proliferação^{92,93}. Além disso, o aumento da HbF reduz a concentração da HbS e consequentemente sua polimerização, evitando a falcização⁹⁴. Outro benefício promovido pela hidroxiuréia após a metabolização da droga é a produção de óxido nítrico, que atua agindo diretamente na produção de HbF e também no endotélio⁹⁵.

Na prática clínica, essa droga é capaz de reduzir o número de crises álgicas, episódios de síndrome torácica, transfusões e a mortalidade destes pacientes⁹³. Segundo Steinberg (1997)⁹⁶ até 50% dos pacientes não poderão se beneficiar da droga por um longo período de tempo por falta de eficácia ou toxicidade. Entre 1992 e 1994 foi realizado o principal estudo multicêntrico, duplo-cego, randomizado e controlado, com a inclusão de 299 pacientes adultos, com o intuito de observar os efeitos da droga em momento de crises de dores (crises vaso-oclusivas). O estudo foi interrompido antes dos 24 meses de tratamento dos pacientes, já que os efeitos benéficos foram precocemente observados⁹⁷.

Devido aos inúmeros trabalhos na área, comprovando a eficácia no tratamento de adultos com doença falciforme, em 1998 a hidroxiuréia tornou-se a única terapia aprovada pela agência regulatória dos Estados Unidos “*Food and Drug Administration*” (FDA) para o tratamento da doença falciforme. Isso trouxe mudanças significativas na qualidade e expectativa de vida dos pacientes, principalmente em países desenvolvidos. Consequentemente, em 2007, a agência regulatória europeia “*European Medicines Agency*” (EMA) autorizou o uso da hidroxiuréia como terapia para o tratamento dos sintomas de doença falciforme em crianças e adultos⁸⁹ (**Figura 4**). Atualmente, recomenda-se o uso da hidroxiuréia desde a primeira infância para a prevenção de possíveis danos irreversíveis nos órgãos⁹⁸.

Estudos mostram que em pacientes com doença falciforme, a hidroxiuréia reduz o número de plaquetas e leucócitos, melhora a função endotelial e promove mudanças na expressão de moléculas de adesão⁹⁹. Diante dos seus efeitos benéficos e multissistêmicos, a hidroxiuréia é considerada uma das principais terapias para o tratamento da doença falciforme, sendo formalmente indicada para pacientes com doença falciforme que apresentam mais de três complicações clínicas ao longo de um ano, como por exemplo, síndrome torácica aguda, episódios vaso-oclusivos graves ou anemia hemolítica grave ¹⁰⁰.

Figura 4. Principais fatos históricos desde a descoberta até a aplicação clínica da hidroxiuréia na doença falciforme.

A hidroxiuréia foi sintetizada na Alemanha em 1869, mas seu potencial biológico não foi reconhecido até 1928, sendo utilizada como agente anti-tumoral na década de 50 (leucemias e tumores sólidos) e de 60 (neoplasias mieloproliferativas). Em 1984, foi relatado que a hidroxiuréia aumenta a produção de hemoglobina fetal em eritrócitos falciformes. Na década de 90, houve o primeiro estudo randomizado utilizando a hidroxiuréia para o tratamento da doença falciforme, e diante dos benefícios, a hidroxiuréia foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Em 2007, o tratamento com hidroxiuréia também foi aprovado pela *European Medicines Agency* (EMA) para uso pediátrico. Fonte: próprio autor

Uma outra opção terapêutica muito utilizada no manejo dos pacientes com doença falciforme é a transfusão sanguínea. Pacientes com doença falciforme necessitam de transfusões, em quantidades similares a de outros pacientes que adquirem doenças graves, devido à reduzida capacidade do transporte de oxigênio e para recomposição do volume sanguíneo em momentos de crises vaso-oclusivas ou de sequestro esplênico¹⁰¹⁻¹⁰³.

As transfusões sanguíneas são indicadas na doença falciforme para a prevenção do AVC primário e secundário, síndrome torácica aguda e dores refratárias ao tratamento com hidroxiuréia, sequestro esplênico agudo e grave em crianças <2 anos de idade e infartos cerebrais silenciosos¹⁰⁴. Outras indicações com menos suporte na literatura incluem a hipertensão pulmonar, priapismo, crises vaso-oclusivas e úlceras de pernas¹⁰⁵.

O principal objetivo da transfusão é manter o hematócrito em 25-30% e a concentração da HbS menor ou igual a 30%, melhorar o transporte de oxigênio e consequentemente a anemia¹⁰⁵, reduzir a viscosidade do sangue e os eventos vaso-oclusivos¹⁰⁶. Entretanto, esta modalidade terapêutica tem algumas desvantagens tais como o risco de transmissão de patógenos, indução de aloimunização e levar a sobrecarga de ferro no organismo^{107,108,109}.

Atualmente, a aloimunização ocorre em torno de 30% dos pacientes e representa uma das maiores complicações das transfusões sanguíneas¹¹⁰. A aloimunização é um processo imunológico que ocorre após a transfusão de eritrócitos de doadores, após a ativação de células T e B do paciente (receptor) e a produção de alo-anticorpos contra antígenos “estranhos” presentes nos eritrócitos de doadores. Alguns cuidados antes da realização das transfusões podem diminuir a taxa de aloimunização nos pacientes com doença falciforme, como por exemplo, realizar a tipificação dos sistemas sanguíneos para verificar se o doador e receptor são compatíveis¹¹⁰.

Outro desafio atual é o estabelecimento de protocolo transfusional para mulheres com doença falciforme durante o período gestacional¹¹¹. É importante ressaltar que a hidroxiuréia não é uma opção terapêutica durante o período gestacional, uma vez que esse fármaco possui atividade teratogênica¹¹². Desta forma, na gravidez, os tratamentos com transfusões sanguíneas tornam-se essenciais. Na literatura, existem controvérsias sobre o uso das transfusões sanguíneas para a prevenção de complicações ao longo do período gestacional e para o uso na amenização das crises de dores que ocorrem em mais de 50% dessas mulheres durante o período de gestação^{105,113,114}.

Atualmente o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas (TCTH) é a única modalidade terapêutica com potencial curativo para doença falciforme. No Brasil, houve a inclusão dessa terapia no Sistema Único de Saúde em 2015, conforme a Portaria nº 30 do SCTIE/MS, publicada dia 1 de julho de 2015 no Diário

Oficial da União. No entanto, o acesso a esse tipo de tratamento é restrito a regiões que possuem bons centros transplantadores de medula óssea⁸⁶.

O TCTH promove a restauração das funções celulares normais da medula óssea, através da infusão de células-tronco hematopoéticas de indivíduos sadios ou traço-falciforme^{115,116}.

Johnson *et al.*¹¹⁷ relataram, em 1984, o primeiro TCTH em uma criança de oito anos com doença falciforme que havia desenvolvido leucemia mieloide aguda. Desde então, diversos estudos tem comprovado a eficácia desta modalidade terapêutica para os indivíduos portadores da doença falciforme¹¹⁸, contudo, a escassez de doadores HLA-idênticos e o alto índice de mortalidade de pacientes com mais de 16 anos de idade, limitam o potencial dessa terapia celular. Outras complicações comuns podem surgir, tais como infecções oportunistas, doença do enxerto contra o hospedeiro, toxicidade e imunoablação duradoura em resposta ao regime de condicionamento utilizado^{119,120}.

O TCTH é indicado principalmente para os pacientes com doença falciforme mais grave (com acidente vascular cerebral na infância, síndromes torácicas repetidas, osteonecrose, nefropatia, alo-sensibilização e priapismo recorrente) que possuem um doador HLA-compatível na família^{10,13,121}.

Tal procedimento inclui uma série de fatores como os regimes de condicionamentos que podem ser mieloablativos (condicionamento de alta intensidade, capaz de destruir todas as células da medula óssea) e não-mieloablativos (condicionamento de intensidade mais baixa, capaz de diminuir o número de células da medula óssea). Os regimes mieloablativos de condicionamento incluem o uso oral de bussulfano (BU) em combinação com a ciclofosfamida (CY) com ou sem globulina anti-timocitária (ATG) ou irradiação linfonodal total (ILT)¹¹⁶.

Bernaudin, *et al.*¹²² demonstraram que o regime de condicionamento com ATG em pacientes com doença falciforme, reduz significativamente as chances de rejeição do enxerto, de 22,6% para 3%. A sobrevida global e a sobrevida livre de doença foram 90% e 80%, respectivamente, para pacientes portadores de doença falciforme com doador HLA compatível, após uma mediana de cinco anos de seguimento^{123,124}. Apesar de não existirem estudos randomizados que comprovem os benefícios em longo prazo do TCTH, foi observado em alguns estudos que pacientes com doença falciforme apresentam restauração do tamanho do baço e de

sua função retículo-endotelial¹²⁵ e melhora das funções neurovascular e pulmonar após transplante¹²⁶.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Apesar de sua importância para a saúde pública mundial e seu grande impacto social, a doença falciforme ainda apresenta muitas questões fisiopatológicas não esclarecidas e desafios terapêuticos, principalmente em relação a: (i), complexidade clínica da doença quanto à gravidade, tipo e número de manifestações clínicas; (ii), descoberta de moduladores genéticos da doença e suas correlações com as diferentes manifestações clínicas; (iii), indicação e uso apropriados das diferentes modalidades terapêuticas que estão atualmente disponíveis; (iv), necessidade do desenvolvimento de novas terapias que sejam capazes de amenizar os sintomas clínicos dos portadores dessa doença²⁵.

Paralelamente, existe a necessidade da descoberta de novos biomarcadores fisiopatológicos e de resposta terapêutica para indivíduos com doença falciforme que sejam capazes de contribuir com informações relevantes para determinar importantes preditores de resposta terapêutica, bem como estudos que avaliem diferentes biomarcadores séricos concomitantemente em pacientes com doença falciforme, as diferentes gravidades da doença e manifestações clínicas, comparando o efeito das diferentes abordagens terapêuticas que estão atualmente disponíveis.

Novos aspectos relacionados à inflamação crônica da doença falciforme têm sido desvendados nos últimos anos, tais como papel do heme, o qual se liga ao TLR4 e induz sinalizações intracelulares que culminam em ativação endotelial e vaso-occlusão⁶³. Os mecanismos de resposta imune adaptativa têm sido estudados pelo nosso grupo de pesquisa nos últimos anos^{127,128}. Portanto, há necessidade de investigações mais profunda sobre a fisiopatologia das doenças falciformes para possibilitar a melhoria das terapias usuais e para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas que sejam seguras e eficazes em um futuro próximo.

Nossa hipótese é que os níveis séricos elevados de biomarcadores relacionados à inflamação e a ativação endotelial e plaquetária diminuem após tratamento com hidroxiuréia, transfusão crônica e TCTH (diferentes modalidades terapêuticas atuais). Acreditamos que o TCTH, devido às altas doses de

imunossupressão administradas aos pacientes e a resposta clínica dos pacientes, sejam capazes de diminuir os níveis séricos desses biomarcadores mais que os outros tratamentos. Por outro lado, levantamos a hipótese de que moléculas imunomoduladoras aumentem no soro dos pacientes com doença falciforme após tratamento com as diferentes modalidades terapêuticas atuais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Quantificar os níveis séricos de biomarcadores relacionados à inflamação, ativação endotelial e plaquetária, e imunomodulação em pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas.

3.2. Objetivos específicos

- Quantificar em amostras de soro de indivíduos sadios e de pacientes com doença falciforme sem tratamento ou tratados com hidroxiuréia, transfusão crônica ou transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas:
 - biomarcadores de ativação endotelial (VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, P-selectina, HGF, FGF, VEGF-A, endothelina-1, CXCL4/PF4 e TGF- β e óxido nítrico);
 - biomarcadores de ativação plaquetária (von Willebrand e trombomodulina);
 - biomarcadores de inflamação (IL-1 β , pentraxina-3, IL-18, IL-6, IL-8, IL-2, IL-17A, TNF- α , INF- γ , CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1 β , IL-12p70, IL-33, IL-27, GM-CSF, CD163, osteopontina, BAFF, APRIL e heme);
 - biomarcadores relacionados à imunomodulação (arginase-1 e IL-10);
- Realizar a análise global através de correlação entre os biomarcadores analisados;
- Classificar e indicar os grupos estudados de acordo com a intensidade do perfil de produção dos biomarcadores.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Casuística

4.1.1 Aspectos éticos de pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), “Avaliação dos mecanismos imunológicos, hematológicos e inflamatórios em pacientes com anemia falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas” (Número do parecer do CEP: 1.011.064, data 01/04/15) e “Transplante de Medula Óssea em anemia falciforme: impacto do procedimento sobre marcadores da doença e qualidade de vida” (Número do parecer do CEP: 1.095.730, data 27/05/15), conforme previsto na resolução n°. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Todos os participantes assinaram o termo de assentimento e/ou consentimento livre e esclarecido, previamente aprovados pelo CEP.

4.1.2 Pacientes com doença falciforme

Foram estudados pacientes com doença falciforme (n=65), sendo 14 pacientes sem nenhum tratamento e 51 submetidos a diferentes modalidades terapêuticas: (i) tratamento com hidroxiuréia (n=15); (ii) tratamento com transfusão crônica (n=15); (iii) tratamento com transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas (TCTH) (n=21) do Ambulatório de Hemoglobinopatias do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do Hospital das Clínicas da FMRP-USP e da Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (**Figura 5**). Os pacientes foram selecionados para o estudo pelos pós-graduandos envolvidos no projeto e por médicos hematologistas do Hemocentro de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, com base nos dados e história clínica. Os pacientes foram abordados em visitas de rotina e foram convidados a participar do estudo. A maioria dos pacientes com doença falciforme selecionados para o estudo se declarou afrodescendentes. Foram coletadas amostras de 10 mL de sangue periférico. Em seguida, o soro foi separado e congelado a -80° C para ensaios futuros.

O grupo de pacientes sem tratamento foi constituído por pacientes com doença falciforme sem uso de hidroxiuréia e/ou transfusões no último ano, com doença estável e sem manifestações clínicas graves no momento da coleta. O grupo de pacientes que recebeu tratamento com hidroxiuréia fazia uso crônico da medicação por período mínimo de 6 meses, sem histórico de transfusão no último ano (dose média de hidroxiuréia utilizada pelos pacientes: 21,15 mg/kg/dia); a dose foi ajustada de acordo com a melhora clínica ou até a dose máxima tolerada e as indicações clínicas para o tratamento com hidroxiuréia foram principalmente: crises vaso-oclusivas de repetição (n=6); síndrome torácica aguda (n=8) entre outros.

O grupo de pacientes que recebeu tratamento com transfusão crônica fazia uso de duas transfusões mensais, por período mínimo de 6 meses, sem histórico de uso de hidroxiuréia no último ano. Os pacientes submetidos ao TCTH eram pacientes graves que já tinham sido tratados com hidroxiuréia ou transfusões e cumpriam os critérios de inclusão estabelecidos pelo protocolo clínicos do TCTH do HC-FMRP-USP. O regime de condicionamento foi mieloablativo e constituído de bussulfano (via endovenosa ou oral), fludarabina (via endovenosa) e ATG (via endovenosa). Os pacientes receberam TCTH alogênico de doador HLA-idêntico. Como profilaxia para a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), os pacientes receberam metotrexato no D+1, D+3, D+6 e D+11 (15mg/m²; endovenoso) e ciclosporina. A via endovenosa a partir de D-1 até a enxertia (3mg/kg/dia) e depois via oral (com a dose correspondente e de acordo com nível sérico). As amostras de sangue periférico fora, colhida dos pacientes transplantados um ano (360 dias) após a realização do TCTH.

As características clínico-laboratoriais dos pacientes com doença falciforme incluídos no estudo estão descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com doença falciforme incluídos no estudo.

Características Clínicas	Sem tratamento n=14	Tratados com HU n=15	Tratados com Transfusão n=15	Tratados com TCTH n=21
Genótipo [n (%)]				
HbSS	14 (100)	15 (100)	15 (100)	14 (67)
HbSC	0	0	0	2 (10)
HbSB ⁰	0	0	0	5 (23)
Idade, mediana (intervalo)	21 (12-37)	21 (10-35)	19 (10-31)	15 (7-36)
Gênero, n (%)				
Masculino/Feminino	7 (50) / 7 (50)	6 (40) / 9(60)	8 (53) / 7(47)	14 (67) /7 (33)
Complicações Clínicas [n (%)]				
Crise vaso-oclusiva	4 (29)	7 (47)	2 (13)	9 (43)
Síndrome torácica aguda	1 (7)	10 (67)	0	6 (29)
Crises álgicas	1 (7)	0	0	0
Osteonecrose	2 (14)	0	0	0
Úlceras venosa	1 (7)	0	2 (13)	2 (10)
Retinopatia	1 (7)	0	0	0
Acidente vascular cerebral	0	0	3 (20)	6 (29)
Vasculopatia cerebral	0	0	11 (73)	4 (19)
Exames Laboratoriais [mediana, mínimo - máximo)				
Hemoglobina g/dL	8,65 (6,9-11,9)	9,6 (7,3-11,4)	8,4 (7,2-9,8)	11,6 (9,1-16,6)
Hemoglobina S (%)	84,5 (75,7-93,5)	78,6 (65,7-88,8)	38,4 (16-68,8)	32,55 (16,9-40,8)
Hemoglobina Fetal (%)	12 (5-20,9)	17,9 (5,8-26,7)	2,1 (0,8-12,4)	0,8 (0,2- 2,8)
Lactato desidrogenase (U/L)	903 (369 -1643)	675 (472- 1233)	784 (425-1656)	414 (281-956)
Bilirrubina indireta (mg/dL)	2,85 (0,94-5,88)	1,78 (0,6-9,36)	3,2 (1,5- 5,46)	0,34 (0,22-1,02)
Hematócrito (%)	25,5 (24-32)	30 (22-35)	24 (21-29)	32,6 (22,2-50)
Volume corpuscular Médio (fL)	92,5 (9,7-107)	115 (76- 130)	90 (85- 102)	90,7 (82-104)
Reticulócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	0,182 (0,25-0,382)	0,114 (0,6-0,216)	0,141 (0,12-0,474)	0,58 (0,018-0,216)
Leucócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	10,6 (8,2-21,1)	7,2 (4,0-10,2)	13 (7,9- 30,2)	6,3 (3,6-11,30)
Neutrófilos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6,4 (3,9-15,9)	3,8 (2,0-12,5)	7,5 (2,9-23,7)	4,25 (0,9-6,7)
Monócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	0,9 (0,4-1,7)	0,4 (0,2-0,7)	0,7 (0,4-1,0)	0,8 (0,3-2,6)
Plaquetas ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	447(319-771)	327 (144-786)	518 (106-831)	323 (99-504)

Abreviações: Hb, hemoglobina; HU, hidroxiuréia; TCTH, transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas.

4.1.3 Indivíduos sadios (controles)

Indivíduos sadios, doadores de sangue voluntários do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do Hospital das Clínicas da FMRP-USP ou da comunidade científica (n=19) foram pareados com os pacientes em relação à idade e sexo. Os indivíduos sadios apresentaram de 11 a 56 anos, sendo 9 do gênero masculino e 10 do gênero feminino, todos se declararam afrodescendentes (**Figura 5**). Os indivíduos sadios estavam sem uso de medicações anti-inflamatórias, analgésicas ou anticoagulantes. Foram coletadas amostras de 10 mL de sangue periférico. Em seguida, o soro foi separado e congelado a -80° C para ensaios futuros.

Figura 5. Modelo de inclusão e divisão dos indivíduos sadios e pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas

Os grupos analisados foram constituídos por 84 indivíduos pareados segundo a idade e gênero. Os pacientes com doença falciforme foram divididos de acordo com a modalidade terapêutica administrada ou ausência dela conforme indicado na figura. O número de pacientes ou indivíduos sadios de cada grupo, o gênero, a distribuição e a mediana de idade estão indicados.

4.2. Quantificação de heme sérico

Para determinação dos níveis séricos de heme, utilizamos o Kit *Heme assay* MAK316 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, o ensaio foi realizado em placas de 96 poços, onde cada reação consistiu de 50 µL da amostra e 200 µL do reagente

fornecido pelo kit, totalizando 250 μL de reação. Um poço contendo, 50 μL de água ou 50 μL de heme calibrador e 200 μL do reagente fornecido pelo kit foram utilizados como controle negativo ou como amostra calibradora. A placa foi levemente agitada para misturar os reagentes e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. A absorbância foi lida em 400 nm no espectrofotômetro (SpectraMax, Molecular Devices, San Jose, CA, EUA) e a concentração total de heme foi determinada para cada amostra com base na amostra calibradora de acordo com as instruções do fabricante.

4.3. Quantificação de óxido nítrico sérico

A quantificação dos produtos do metabolismo do óxido nítrico (nitrito e nitrato) foi realizada a partir do ensaio colorimétrico baseado na reação de GREISS¹²⁹. Em placas de 96 poços foram distribuídas 50 μL da amostra de soro de cada paciente. A curva padrão foi preparada a partir do reagente NaNO_2 (S2252; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluída em 10 mL de água destilada. Em cada poço foram colocados 50 μL de NO_2^- a 200 μM . Foi realizada uma diluição seriada (1:2) com o meio de cultura RPMI. Em seguida foi preparada a solução de Greiss com *need* 0,1% (N-9125; Sigma-Aldrich) e sulfanilamida 1% (S9251; Sigma-Aldrich) na qual foi adicionado 50 μL da solução em cada poço da placa contendo amostras ou pontos da curva padrão. A placa foi incubada por 5 minutos no escuro a temperatura ambiente. A absorbância foi lida em 554 nm em espectrofotômetro (SpectraMax, Molecular Devices, San Jose, CA, EUA).

4.4. Quantificação de biomarcadores séricos pela metodologia ELISA

Três analitos (IL-1 β , TGF- β e Arginase-1) foram quantificados no soro pela metodologia ELISA. Os kits *Human ELISA* foram adquiridos da R&D systems (Minneapolis, MN, EUA) ou Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As análises foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. A concentração dos analitos em cada amostra foi determinada a partir dos dados da curva padrão e com o auxílio do software Softmax Pro 6.2.1 (Molecular

Devices, Sunnyvale, CA, EUA). A dose mínima detectável para os ensaios ELISA foi fornecida pelo respectivo fabricante.

4.5. Quantificação de biomarcadores séricos pela metodologia multiplex

Trinta analitos relacionados à inflamação como citocinas (IL-2, TNF- α , INF- γ , IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-27, IL-33; IL-10), quimiocinas (CCL4/MIP-1 β , CCL2/MCP-1) e outros mediadores inflamatórios (GM-CSF, pentraxina-3, osteopontina, CD163, BAFF e APRIL); 2, ativação plaquetária (trombomodulina e vWFA2); 3, ativação endotelial (VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, P-selectina, HGF, FGF, VEGF-A, endothelina-1 e CXCL4/PF4) foram quantificados no soro utilizando a metodologia multiplex de acordo com as instruções do fabricante (Magnetic Luminex Assay, R&D System Inc., Minnesota, EUA). Em resumo, as proteínas de cada curva padrão (11 curvas padrão: 3, A, I, G, B, H, J, C, M, F e S - lote L122803) foram reconstituídas em 250 μ L de *calibrator diluent RD6-52* e incubadas por 15 minutos sob agitação leve. Após a incubação, foram adicionados 100 μ L de cada curva padrão e 100 μ L de *calibrator diluent RD6-52* (volume final de 1000 μ L), estabelecendo o ponto inicial da curva, a partir do qual foi realizada uma diluição seriada (1:3). As micropartículas de captura foram diluídas em *diluent RD2-1* (500 μ L de micropartícula e 5000 μ L de diluente), os anticorpos biotinilados também foram diluídos em *diluent RD2-1* (500 μ L de anticorpos e 5000 μ L de diluente) e a estreptavidina-PE em *wash buffer* (220 μ L de estreptavidina e 5035 μ L de tampão). As amostras foram diluídas 2 vezes em *calibrator diluent RD6-52* (30 μ L de amostra e 30 μ L de tampão).

Um total 50 μ L das micropartículas, 50 μ L da curva padrão ou 50 μ L de cada amostra foram pipetados por poço e a placa foi incubada por 2 horas à 850 rpm, a temperatura ambiente e protegida da luz em uma placa de 96 poços. Após a incubação, a placa foi colocada em um magneto (permitindo que as micropartículas magnéticas ficassem presas) para a realização de 3 lavagens com 100 μ L de *wash buffer*. A placa foi retirada do magneto, 50 μ L de anticorpos biotinilados foram adicionados em cada poço e novamente a placa foi incubada por 1 hora a 850 rpm, a temperatura ambiente e protegida da luz. A placa foi lavada 3 vezes com 100 μ L de *wash buffer*, 50 μ L de estreptavidina-

PE foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada por 30 minutos à 850 rpm, temperatura ambiente e protegida da luz. A placa foi lavada 3 vezes com 100 µL de *wash buffer*, 100 µL *wash buffer* foram adicionados em cada poço, a placa foi incubada por 2 minutos à 850 rpm e colocada no aparelho (Bio-Plex 200) para a leitura.

4.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Instat 5 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA). Para as comparações entre grupos, o teste ANOVA e o pós-teste de Bonferroni foram utilizados. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A correlação entre os níveis séricos dos biomarcadores foi compilada utilizando o software Cytoscape (version 2.8; <http://www.cytoscape.org>)¹³⁰. As redes de conexões foram construídas usando o modelo de círculos e o formato e a espessura das linhas exibem a pontuação do índice de correlação (r) como negativa ($r < 0$), fraca ($r \leq 0.35$), moderada ($0.36 \geq r \leq 0.67$), e forte ($r \geq 0.68$)¹³¹. Os dados brutos das correlações estão descritos nos **Apêndices 1-5**.

A análise do perfil de biomarcadores foi avaliada para caracterizar o padrão geral de biomarcadores de cada grupo, conforme sugerido anteriormente por Vitelli-Avelar e colaboradores¹³², na qual as porcentagens de produção dos biomarcadores foram compiladas usando uma plataforma de quatro passos, modificada da seguinte forma: (i) análise estatística convencional; (ii) estabelecimento da mediana global de biomarcadores para cada grupo; (iii) classificação de cada grupo como produtores baixo ou alto de cada biomarcador, utilizando o valor mediano como ponto de corte; (iv) criação de diagramas em escala preto e branco para cada grupo. Os resultados foram considerados relevantes quando a frequência foi $\geq 50\%$ (altos produtores), sendo estes realçados em negrito e sublinhados. Os gráficos de radar foram construídos usando o Microsoft Excel (Microsoft Office 2013, Las Vegas, EUA) para caracterizar a frequência geral de indivíduos que expressam altos níveis de cada biomarcador em cada grupo estudado. Essa abordagem tem sido descrita como relevante para detectar, com alta sensibilidade, pequenas

alterações putativas em perfis laboratoriais que não são detectáveis por abordagens estatísticas convencionais¹³²⁻¹³⁴.

6. DISCUSSÃO

Os resultados desse trabalho mostraram o impacto das principais modalidades terapêuticas disponíveis atualmente para o tratamento da doença falciforme sob o perfil sérico de 35 biomarcadores (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento entre outros mediadores inflamatórios e moléculas imunomoduladoras). Dentre os 35 biomarcadores avaliados, 9 estavam com níveis altos nos pacientes com doença falciforme sem tratamento em relação aos indivíduos saudáveis.

Na doença falciforme a interação entre eritrócitos danificados e células endoteliais, bem como leucócitos e plaquetas iniciam um papel central na oclusão vascular. Há evidências que células endoteliais são ativadas pelo contato direto de células falciformes, heme e hemoglobina livres, e as espécies reativas de oxigênio induzidas por hipóxia³⁴. A redução da biodisponibilidade do óxido nítrico provavelmente induz a expressão de moléculas de adesão e a síntese de endotelina-1. A adesão de eritrócitos e leucócitos no endotélio vascular é a resposta do aumento da expressão de moléculas de adesão como VCAM-1, ICAM-1, P-selectina e E-selectina¹³⁵⁻¹³⁷. Células endoteliais ativadas promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-8, contribuindo, assim, para o caráter inflamatório crônico dos pacientes com doença falciforme^{138,139}.

Dessa forma, moléculas de adesão como, ICAM-1, VCAM-1, E-selectina e P-selectina contribuem para a patogênese da doença falciforme em muitos aspectos, incluindo o recrutamento e ligação de células inflamatórias no endotélio vascular, particularmente nas vênulas^{49,140}. Em nosso estudo, os níveis séricos de VCAM-1 ou E-selectina foram maiores em pacientes com doença falciforme sem tratamento quando comparado aos indivíduos saudáveis, enquanto que P-selectina demonstrou estar aumentada no grupo de pacientes que foram submetidos ao TCTH. VCAM-1 é uma molécula de adesão vascular que pertence à superfamília de imunoglobulina e é amplamente expressa pelo endotélio vascular ativado por citocinas¹⁴¹. VCAM-1 interage principalmente

com β -integrina-1 e VLA-4, em leucócitos mononucleares, eosinófilos e basófilos. A interação VCAM-1/VLA-4 inicia um processo fisiopatológico fundamental nas respostas imunes, a migração de leucócitos nos locais de inflamação¹⁴¹.

Colella *et al.* (2015)¹⁴², demonstraram níveis aumentados de VCAM-1 em pacientes com doença falciforme HbSC (n=23) e com anemia falciforme HbSS (n=20) sem tratamento com hidroxiuréia, corroborando nossos achados. Kato *et al.* (2005)⁴⁹ demonstraram a redução dos níveis séricos de VCAM-1 em pacientes com anemia falciforme após o tratamento com hidroxiuréia. No presente estudo, não houve diferença significativa nos níveis de VCAM-1 em pacientes tratados com hidroxiuréia em comparação aos pacientes sem tratamento. Duits *et al.* (1996)¹⁴³ demonstraram que pacientes com doença falciforme possuem altos níveis séricos de VCAM-1 em comparação com indivíduos controles saudáveis. Nesse mesmo estudo, os autores relataram que os níveis séricos de VCAM-1 aumentaram em pacientes durante as crises vaso-oclusivas, sugerindo que essa molécula está associada com o mecanismo complexo de vaso-oclusão na doença falciforme¹⁴³. Vale ressaltar que em nosso estudo os níveis séricos de VCAM-1 foram significativamente menores nos pacientes submetidos ao TCTH em comparação com os pacientes sem tratamento.

Em relação a outras moléculas de ativação endotelial avaliadas nesse trabalho, observamos os níveis de endotelina-1, FGF, VEGF-A, ICAM-1 e óxido nítrico não diferiram entre os pacientes que receberam as diferentes modalidades terapêuticas. Por outro lado, os níveis séricos de TGF- β e HGF foram maiores em pacientes tratados com transfusão crônica quando comparado aos pacientes tratados com hidroxiuréia, submetidos ao TCTH e grupo de indivíduos saudáveis.

Croizat e Nageal¹⁴⁴ (1999) quantificaram TGF- β em pacientes com doença falciforme com diferentes níveis de HbF, e demonstraram altas concentrações plasmática de TGF- β em todos os pacientes. Bao *et al.* (2011)⁷⁸, descreveram o aumento plasmático de TGF- β em pacientes com doença falciforme aloimunizados em comparação com indivíduos saudáveis. Estudos mostraram que o TGF- β está fortemente associado com diversas complicações clínicas, tais como priapismo e a hipertensão pulmonar^{145,146}, Yang *et al.*¹⁴⁷

mostraram que num ambiente pró-inflamatório, IL-21 e TGF- β são capazes de promover a diferenciação de células Th17, as quais contribuem para o estado inflamatório crônico da doença falciforme.

Observamos uma diferença nos os níveis séricos de TGF- β que foram significativamente maiores no grupo de pacientes com doença falciforme tratados com transfusão quando comparado aos pacientes tratados com hidroxiuréia, assim sugerimos que a diminuição da concentração de TGF- β seja um dos mecanismos pelos qual essa droga reduz diversas complicações clínicas da doença falciforme.

Qari *et al.*⁵³ (2012) demonstraram que os pacientes com doença falciforme (N=101) possuem um aumento sérico sustentado de HGF durante uma crise álgica (vaso-oclusiva) comparando com período de estabilidade da doença e com indivíduos controles sadios. Em nosso estudo, os níveis séricos de HGF nos pacientes com doença falciforme tratados a partir da transfusão crônica foram iguais aos dos pacientes com doença falciforme sem tratamento, porém, foram mais altos em comparação com indivíduos sadios, pacientes com doença falciforme tratados com hidroxiuréia ou submetidos ao TCTH.

Outro biomarcador quantificado neste projeto foi a quimiocina CXCL4 (PF4). Os pacientes com doença falciforme sem tratamento (com doença estável no momento da coleta, sem crises e manifestações graves) apresentarem níveis séricos elevados de CXCL4 em comparação com os pacientes tratados e indivíduos sadios. Dentre várias outras funções, foi descrito que CXCL4 inibe ativação células T e induz diferenciação de células T reguladoras¹⁴⁸. Podemos sugerir que, através desses mecanismos, essa quimiocina promove um papel central no controle da inflamação nos pacientes com doença falciforme em estado estável.

Uma vez que ativação plaquetária tem um papel essencial na patogênese da doença falciforme, nós quantificamos dois biomarcadores relacionados à ativação plaquetária e coagulação, a trombomodulina e o fator de Von Willebrand (vWF-A2). Alguns estudos têm demonstrado que a hidroxiuréia é capaz de reduzir o estado de hipercoagulabilidade característico dos pacientes com doença falciforme^{142,149}. É importante ressaltar que os eventos tromboembólicos constituem uma causa importante de mortalidade na doença falciforme^{150,151,152}. Portanto, a demonstração do impacto das diferentes

modalidades terapêuticas sobre os níveis de biomarcadores de ativação plaquetária e coagulação pode tanto ajudar na identificação de pacientes com maior risco, quanto possibilitar a melhor opção terapêutica para cada caso.

Em nosso trabalho, a concentração sérica de trombomodulina foi maior no grupo de pacientes com doença falciforme submetidos ao TCTH em comparação com os outros grupos de pacientes ou indivíduos saudáveis. Também não foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos de vWF-A2 entre os pacientes tratados com as diferentes modalidades terapêuticas, pacientes sem tratamento e os indivíduos saudáveis. Em contraste com nossos resultados, um estudo demonstrou níveis aumentados de vWF em 30 pacientes com anemia falciforme (HbSS)¹⁵³.

Conforme já citado anteriormente, o estado inflamatório crônico é característico em pacientes com doença falciforme^{24,25}. Vários trabalhos demonstraram níveis elevados de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios em pacientes com doenças falciformes, com diferentes gravidades e manifestações clínicas, sem tratamento ou tratados com hidroxiuréia ou transfusão crônica^{53,24,25,154}.

Além da quantificação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, quantificamos também moléculas relacionadas à inflamação e/ou ativação de células do sistema imune, descritas mais recentemente na literatura. Essas moléculas foram CD163, osteopontina, pentraxina-3, BAFF, APRIL e heme^{59,155-159}.

Neste presente estudo, os níveis de CD163, pentraxina-3 e osteopontina não diferiram entre todos os grupos de pacientes com doença falciforme e indivíduos controles saudáveis. Portanto, não se revelaram como biomarcadores de doença nem de resposta terapêutica importantes.

Em relação às moléculas BAFF/APRIL, os pacientes submetidos ao TCTH apresentaram níveis séricos elevados de BAFF quando comparado com os indivíduos saudáveis, pacientes sem tratamento e pacientes tratados com hidroxiuréia ou transfusão crônica. Em contrapartida, níveis elevados de APRIL foram observados em pacientes com a doença falciforme sem nenhum tratamento e nos pacientes tratados com transfusão, em comparação aos demais grupos.

As moléculas BAFF (*ligands B cell activation factor*) e APRIL (*A proliferation-inducing ligand*) pertencem à família do TNF, cuja função é indispensável para o desenvolvimento, diferenciação, maturação e ativação de células B¹⁶⁰. As interações entre BAFF e APRIL desencadeiam diversas vias de sinalização que incluem ativação de caspases e a translocação de NFκB¹⁶¹. É descrito que a superexpressão de BAFF resulta em distúrbios autoimunes graves em camundongos¹⁶² e altos níveis séricos dessa molécula já foram encontrados em pacientes com doenças autoimunes, como artrite reumatóide.

Além disso, BAFF pode ser induzido por INF-γ produzido por macrófagos, monócitos e células dendríticas, ou por IL-10 produzida por macrófagos¹⁶². Outros estudos mostram uma forte associação entre INF-γ^{163,164} e indução da expressão de BAFF e IL-10¹⁶⁴.

Pacientes com doença falciforme apresentam longos períodos de inflamação crônica, tal como observado em doenças autoimunes como a artrite reumatóide¹⁶⁵ e a síndrome de Sjögren¹⁶⁶. Alguns estudos sugerem uma possível associação entre inflamação crônica, alguns distúrbios autoimunes e níveis elevados de BAFF¹⁶¹. A inflamação crônica pode aumentar os níveis séricos de BAFF, causando ativação desregulada de células B, e consequente perda da tolerância imunológica e indução de autoimunidade¹⁶⁷. A literatura não dispõe de estudos que correlacionam BAFF e indivíduos com doença falciforme que foram submetidos a diferentes modalidades terapêuticas, porém, em estudos recentes do nosso grupo de pesquisa observou-se que os indivíduos submetidos ao TCTH (após 1 ano) possuem o aumento de células T naíve e consequentemente um aumento de BAFF, assim sugerimos que o aumento de BAFF nos pacientes com doença falciforme pode levar a melhora da inflamação a partir da resposta humoral¹²⁷.

Em relação aos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, demonstramos que os pacientes tratados com transfusão crônica apresentaram maiores níveis de CCL4, TNF-α, IL-17A, INF-γ, IL-6, IL-33, IL-18 e IL-27 quando comparados com os indivíduos saudáveis. Os pacientes tratados com transfusão crônica também apresentaram altos níveis séricos de TNF-α quando comparado com pacientes tratados com hidroxiuréia. Já o grupo de pacientes tratados com hidroxiuréia foi o único que apresentou níveis séricos de TNF-α similares aos de indivíduos saudáveis.

Os pacientes com doença falciforme sem tratamento apresentam um perfil inflamatório intenso, com níveis elevados das quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias CCL4, CXCL4, INF- γ , TNF- α , IL-17A, IL-18 e IL-27, além de APRIL, VCAM-1 e E-selectina, quando comparados aos níveis dessas moléculas em indivíduos controles saudáveis. Essa comparação é importante para ressaltar a necessidade da identificação de novos biomarcadores para uso clínico na doença falciforme. A participação da IL-18 na patogênese da doença falciforme foi recentemente descrita na literatura^{58,168}. A IL-18, um membro da família IL-1, é semelhante a IL-1 β por ser processada pela caspase-1 para uma forma madura biologicamente ativa de 18 kDa. IL-18 usa a mesma via de sinalização da IL-1 β para ativar NF- κ B e induzir a produção de mediadores inflamatórios, tais como moléculas de adesão, quimiocinas e Fas-ligante^{169,170}.

Ressaltamos que os níveis de IL-18 se encontraram altos em pacientes com doença falciforme sem tratamento e tratados com transfusão crônica ou hidroxiuréia, em comparação com indivíduos saudáveis. Destacamos que pacientes com doença falciforme tratados com TCTH apresentarem baixos níveis séricos de IL-18, similares aos de indivíduos saudáveis, além de níveis séricos de IL-18 significativamente menores que os pacientes com doença falciforme sem tratamento ou tratados com transfusão crônica. Recentemente, Duarte *et al.*¹⁷¹ (2016) mostraram que pacientes com doença falciforme que cursam com disfunção cardíaca apresentaram níveis séricos elevados de IL-18. Um outro estudo desenvolvido por Cerqueira *et al.* (2011)⁵⁸ indicam a relação de IL-18 com marcadores de hemólise, disfunção endotelial e outros níveis de citocinas de pacientes com doença falciforme, o que sugere que a IL-18 possui grande influência na fisiopatologia da oclusão vascular.

Estudos recentes têm mostrado que a citocina IL-27 tem um duplo papel, sendo considerada pró-ou anti-inflamatória em diferentes contextos fisiopatológicos^{172,173}. Peng *et al.* (2018)¹⁷⁴ demonstraram que a citocina IL-27 tem um papel importante no desenvolvimento bem como na resolução da Síndrome de Guillain-Barré.

Um estudo recente de Alagbe *et al.*¹⁷² (2017) demonstrou que os níveis de IL-27 estavam aumentados em pacientes com anemia falciforme (HbSS) em comparação com indivíduos saudáveis, de forma similares aos nossos resultados. Porém, nesse estudo, os níveis de IL-27 não foram avaliados em pacientes

tratados com transfusão crônica. Os autores também mostraram que os níveis de IL-27 foram similares entre indivíduos saudáveis e pacientes tratados com hidroxiuréia¹⁷², corroborando também nossos achados.

Nossos resultados mostraram níveis elevados em pacientes sem tratamento e tratados com transfusão crônica, em comparação com indivíduos saudáveis. Os pacientes tratados com hidroxiuréia e TCTH apresentaram concentrações séricas de IL-27 similares às de indivíduos controles saudáveis. Vale ressaltar que os pacientes com doença falciforme não tratados (em período de estabilidade da doença e sem necessidade de tratamento) avaliados nesse estudo apresentaram níveis séricos de IL-27 maiores do que os indivíduos saudáveis, sugerindo um possível papel dessa citocina no controle da inflamação nesses pacientes.

A IL-33 é uma proteína multifuncional, que pode atuar como uma citocina pró-inflamatória ou como um fator nuclear associado a cromatina¹⁷⁵. Esta citocina está associada à patogênese de várias doenças inflamatórias, autoimunes e alérgicas^{176,177,178}. Em nosso estudo, níveis séricos elevados de IL-33 foram encontrados no grupo de pacientes com doença falciforme sem tratamento e nos pacientes tratados com transfusão crônica, quando comparados aos indivíduos saudáveis. Nossas análises de correlação também mostraram que os níveis séricos elevados de IL-33 e IL-6 estão relacionados nos pacientes com doença falciforme sem tratamento e tratados com transfusão crônica. De fato, já foi descrito que a IL-33 é capaz de induzir a expressão de IL-6, uma proteína pró-inflamatória de fase aguda que atua em diversos contextos, incluindo na ativação endotelial^{179,180}.

Dentre as outras moléculas inflamatórias quantificadas em nosso estudo, destacamos o heme livre. Níveis elevados de heme foram detectados no soro dos pacientes com doença falciforme tratados com transfusão e com hidroxiuréia. Apesar de pacientes tratados com hidroxiuréia apresentarem níveis baixos de vários biomarcadores inflamatórios, estes pacientes apresentaram níveis altos de heme, indicando que anemia hemolítica em atividade liberando moléculas de heme livre que vão estimular o sistema imunológico via TLR4⁶³.

Nós avaliamos também os níveis séricos de duas moléculas imunomoduladoras, IL-10 e arginase-1. Pacientes com doença falciforme

apresentam altos níveis de IL-10 em estado estável e níveis reduzidos dessa citocina durante as crises álgicas⁵⁶. Os pacientes da nossa coorte que foram submetidos ao grupo do TCTH apresentaram níveis sérios mais altos de IL-10 quando comparado com pacientes tratados com hidroxiuréia. A IL-10 é uma molécula anti-inflamatória produzida por células imunes reguladoras, tais como células T e B reguladoras¹⁸¹. Podemos sugerir que aumento de níveis séricos dessa molécula nos pacientes transplantado seja importante para controle da inflamação e melhora das manifestações clínicas observadas nesses pacientes após o transplante. Os níveis séricos de arginase-1 não diferiram entre os pacientes com doença falciforme com ou sem tratamento e indivíduos saudáveis, em contraste um estudo que mostrou um aumento significativo nos níveis de arginase-1 em pacientes com doença falciforme tratados com hidroxiuréia em comparação com indivíduos saudáveis^{53,182}.

A análise integrada dos biomarcadores séricos em indivíduos saudáveis e em pacientes com doença falciforme submetidos a diferentes modalidades terapêuticas realizada no presente estudo evidenciou uma rede de conexões complexa nos indivíduos saudáveis e pacientes com doença falciforme tratados com hidroxiuréia, sugerindo que os processos dependentes de uma regulação fina ainda estão preservados nesses grupos. Nossos achados em relação ao grupo de indivíduos saudáveis estão de acordo com outros estudos e em doenças com alta produção de citocinas inflamatórias, como a mielofibrose primária, os números de conexões é reduzido¹⁸³, assim como observado nos pacientes com doença falciforme sem tratamento ou submetidos à transfusão crônica. Corroborando esse cenário, nossos resultados indicam que indivíduos saudáveis e pacientes com doença falciforme tratados com hidroxiuréia também apresentam um número menor de biomarcadores inflamatórios com alta produção quando analisado do ponto de vista global. De forma surpreendente, os pacientes submetidos ao TCTH apresentaram uma rede de conexões com correlações mais fracas e um perfil de alto produtor de biomarcadores inflamatórios, o que é semelhante aos pacientes sem tratamento ou tratados com transfusões crônicas, fato que deverá ser objeto de estudos futuros, especialmente com um seguimento mais longo desses pacientes.

A disfunção na homeostase vascular predominante em indivíduos com doença falciforme é o resultado da interação celular, ativação endotelial e

plaquetária e a influência das moléculas inflamatórias que culmina na oclusão vascular e do fenótipo clínico característico dos indivíduos portadores dessa doença^{58,184}. Estes aspectos clínicos estão correlacionados com a expressão dos perfis de citocinas. Assim, o equilíbrio alterado da complexa rede de citocinas favorece os eventos oclusivos induzindo a ativação de células endoteliais⁵⁸.

A doença falciforme apresenta uma enorme heterogeneidade clínica, com grande variedade de manifestações clínicas e diferentes graus de gravidade. Portanto, mais estudos sobre os mecanismos inflamatório/imunológicos em pacientes com doença falciforme e suas complexas interações continuam sendo necessários para permitirem a identificação de biomarcadores relevantes para prognóstico, monitoramento terapêutico e escolha da terapia mais adequada.

O estudo desenvolvido apresentou limitações importantes ao que se refere à sua população amostral. A população definida para este estudo (indivíduos saudáveis, pacientes com doença falciforme sem nenhum tratamento e os pacientes que foram submetidos a diferentes modalidades terapêuticas) seguiu o critério voluntário e que esses deveriam cumprir os requisitos pré-fixados para a inclusão dos indivíduos neste estudo, bem como, coleta de dados e do material a ser analisado. A correlação genótipo-fenótipo é difícil de estabelecer. Parte da heterogeneidade entre os pacientes poder ser atribuído aos diversos modulares genéticos, cujos quais são bem estabelecidos na literatura, e incluem haplótipos do cluster da globina β , determinantes da concentração de hemoglobina fetal (HbF), talassemia α , entre outros^{185,186}. Entretanto, as metodologias aqui utilizadas permitiram alcançar os objetivos principais, possibilitando análise de dados dos diferentes biomarcadores analisados.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e as análises de correlação, concluímos que os pacientes com doença falciforme sem tratamento, tratados com transfusão crônica ou submetidos ao TCTH apresentaram perfis mais inflamatórios que os pacientes tratados com hidroxiruréia. Os tratamentos com transfusão crônica e TCTH não foram capazes de diminuir os níveis séricos elevados de biomarcadores de inflamação e de ativação endotelial e plaquetária para níveis similares aos dos indivíduos saudáveis. Os pacientes com doença falciforme tratados a partir de transfusão crônica apresentaram o perfil inflamatório mais alto de todos os grupos analisados.

Apesar dos pacientes com doença falciforme tratados com hidroxiruréia apresentarem os menores níveis séricos de biomarcadores de inflamação e de ativação endotelial e plaquetária, estes continuaram apresentando níveis séricos elevados de heme e da citocina pró-inflamatória IL-18.

Os pacientes submetidos ao TCTH apresentaram um perfil inflamatório alto, com níveis elevados de P-selectina, trombomodulina e IL-8 (relacionados à ativação endotelial, plaquetária e inflamação, respectivamente) em comparação com todos os grupos analisados, entretanto, os pacientes transplantados apresentaram níveis séricos de IL-18 significativamente menores que os pacientes com doença falciforme sem tratamento.

Os tratamentos não foram capazes de aumentar níveis séricos de moléculas imunomoduladoras no soro dos pacientes com doença falciforme. Somente o grupo dos pacientes submetidos ao TCTH apresentaram níveis séricos da citocina anti-inflamatória IL-10 similares aos de indivíduos saudáveis, contudo, significativamente maiores que os pacientes tratados com hidroxiruréia.

Os resultados obtidos nesse trabalho podem direcionar estudos futuros para o monitoramento laboratorial de respostas terapêuticas aos diferentes tratamentos atualmente utilizados para doença falciforme e para o desenvolvimento de novos tratamentos ou de terapias complementares às que estão atualmente disponíveis.

REFERÊNCIAS

- 1 Hughes, M., Akram, Q., Rees, D. C. & Jones, A. K. Haemoglobinopathies and the rheumatologist. *Rheumatology (Oxford)* 55, 2109-2118 (2016).
- 2 Williams, T. N. & Thein, S. L. Sick Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* (2018).
- 3 Sangokoya, C., Telen, M. J. & Chi, J. T. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood* 116, 4338-4348 (2010).
- 4 Wajih, N. *et al.* Potential therapeutic action of nitrite in sickle cell disease. *Redox Biol* 12, 1026-1039 (2017).
- 5 Rusanova, I. *et al.* beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Panama. *Am J Hum Biol* 23, 377-380 (2011).
- 6 Silva, M. *et al.* Hemorheological alterations in sickle cell anemia and their clinical consequences - The role of genetic modulators. *Clin Hemorheol Microcirc* 64, 859-866 (2016).
- 7 Adekile, A. D. & Huisman, T. H. Hb F in sickle cell anemia. *Experientia* 49, 16-27 (1993).
- 8 Soares, L. F. *et al.* Prevalência de hemoglobinas variantes em comunidades quilombolas no estado do Piauí, Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva* 22, 3773-3780 (2017).
- 9 Cançado, R. D. & Jesus, J. A. A doença falciforme no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 29, 203-206 (2007).
- 10 Simoes, B. P. *et al.* Allogenic bone marrow transplantation in sickle-cell diseases. *Rev Assoc Med Bras (1992)* 62 Suppl 1, 16-22 (2016).
- 11 Felix, A. A., Souza, H. M. & Ribeiro, S. B. F. Epidemiologic and social aspects of sickle cell disease. *Rev Bras Hematol Hemoter* 32, 203-208 (2010).

- 12 Arduini, G. A., Rodrigues, L. P. & Trovo de Marqui, A. B. Mortality by sickle cell disease in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 39, 52-56 (2017).
- 13 Costa, F. F., Conran, N. & Fertrin, K. Y. in *Tratado de Hematologia* (eds Marco Antonio Zago, Roberto Passetto Falcão, & Ricardo Pasquini) (Atheneu, São Paulo, 2013).
- 14 Purohit, P. *et al.* Comparative study of clinical presentation and hematological indices in hospitalized sickle cell patients with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Public Health* 11, 321-325 (2018).
- 15 Moiz, B. & Majeed, A. No risk reduction for *Plasmodium vivax* malaria in sickle cell disease. *Clin Case Rep* 6, 1187-1188 (2018).
- 16 Herrick, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. *Yale J Biol Med* 74, 179-184 (2001).
- 17 Fitzsimmons, R., Amin, N. & Uversky, V. N. Understanding the roles of intrinsic disorder in subunits of hemoglobin and the disease process of sickle cell anemia. *Intrinsically Disord Proteins* 4, e1248273 (2016).
- 18 Pauling, L., Itano, H. A. & *et al.* Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 109, 443 (1949).
- 19 Neel, J. V. The Inheritance of Sickle Cell Anemia. *Science* 110, 64-66 (1949).
- 20 Dagleish, R. *et al.* Locus Reference Genomic sequences: an improved basis for describing human DNA variants. *Genome Med* 2, 24 (2010).
- 21 Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A. & Wallace, S. E. *GeneReviews*. (University of Washington, 1993-2018).
- 22 Ingram, V. M. Abnormal human haemoglobins. I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by "fingerprinting". 1958. *Biochim Biophys Acta* 1000, 151-157 (1989).
- 23 Sundd, P., Gladwin, M. T. & Novelli, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annu Rev Pathol* (2018).

- 24 Conran, N., Franco-Penteado, C. F. & Costa, F. F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin* 33, 1-16 (2009).
- 25 Kato, G. J. *et al.* Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers* 4, 18010 (2018).
- 26 Frenette, P. S. & Atweh, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest* 117, 850-858 (2007).
- 27 Nahavandi, M., Wyche, M. Q., Perlin, E., Tavakkoli, F. & Castro, O. Nitric Oxide Metabolites in Sickle Cell Anemia Patients after Oral Administration of Hydroxyurea; Hemoglobinopathy. *Hematology* 5, 335-339 (2000).
- 28 Nagel, R. L. *et al.* Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type. *N Engl J Med* 312, 880-884 (1985).
- 29 Zhang, D., Xu, C., Manwani, D. & Frenette, P. S. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood* 127, 801-809 (2016).
- 30 Laurance, S. *et al.* Differential modulation of adhesion molecule expression by hydroxycarbamide in human endothelial cells from the micro- and macrocirculation: potential implications in sickle cell disease vasoocclusive events. *Haematologica* 96, 534-542 (2011).
- 31 Labie, D. & Elion, J. [Molecular and cellular pathophysiology of sickle cell anemia]. *Pathol Biol (Paris)* 47, 7-12 (1999).
- 32 Steinberg, M. H. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *Trends Pharmacol Sci* 27, 204-210 (2006).
- 33 Sakamoto, T. M. *et al.* Increased adhesive and inflammatory properties in blood outgrowth endothelial cells from sickle cell anemia patients. *Microvasc Res* 90, 173-179 (2013).
- 34 Hebbel, R. P. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest* 100, S83-86 (1997).

- 35 Lum, A. F., Wun, T., Staunton, D. & Simon, S. I. Inflammatory potential of neutrophils detected in sickle cell disease. *Am J Hematol* 76, 126-133 (2004).
- 36 Chirico, E. N. & Pialoux, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life* 64, 72-80 (2012).
- 37 Proenca-Ferreira, R. *et al.* Increased adhesive properties of platelets in sickle cell disease: roles for α IIb β 3-mediated ligand binding, diminished cAMP signalling and increased phosphodiesterase 3A activity. *Br J Haematol* 149, 280-288 (2010).
- 38 Dominical, V. M. *et al.* Prominent role of platelets in the formation of circulating neutrophil-red cell heterocellular aggregates in sickle cell anemia. *Haematologica* 99, e214-217 (2014).
- 39 Jackson, S. P., Nesbitt, W. S. & Westein, E. Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost* 7 Suppl 1, 17-20 (2009).
- 40 Davila, J. *et al.* A novel inflammatory role for platelets in sickle cell disease. *Platelets* 26, 726-729 (2015).
- 41 Proenca-Ferreira, R. *et al.* Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients. *PLoS One* 9, e89012 (2014).
- 42 McEver, R. P. & Cummings, R. D. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 100, 485-491 (1997).
- 43 Graido-Gonzalez, E. *et al.* Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. *Blood* 92, 2551-2555 (1998).
- 44 Belcher, J. D. *et al.* Critical role of endothelial cell activation in hypoxia-induced vasoocclusion in transgenic sickle mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H2715-2725 (2005).
- 45 Aslan, M. & Freeman, B. A. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radic Biol Med* 43, 1469-1483 (2007).

- 46 Tak, P. P. & Firestein, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107, 7-11 (2001).
- 47 Conran, N. *et al.* Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. *Br J Haematol* 124, 547-554 (2004).
- 48 Sun, Z. & Andersson, R. NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock* 18, 99-106 (2002).
- 49 Kato, G. J. *et al.* Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br J Haematol* 130, 943-953 (2005).
- 50 Platt, O. S. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *J Clin Invest* 106, 337-338 (2000).
- 51 Hebbel, R. P., Osarogiagbon, R. & Kaul, D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation* 11, 129-151 (2004).
- 52 Puliyl, M. M. Genomic biomarker in sickle cell disease. *Blood* 129, 2956-2957 (2017).
- 53 Qari, M. H., Dier, U. & Mousa, S. A. Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. *Clin Appl Thromb Hemost* 18, 195-200 (2012).
- 54 Lanaro, C. *et al.* Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol* 85, 235-242 (2009).
- 55 Carvalho, M. O. S. *et al.* Inflammatory mediators in sickle cell anaemia highlight the difference between steady state and crisis in paediatric patients. *Br J Haematol* (2017).
- 56 Sarray, S. *et al.* Serum IL-6, IL-10, and TNFalpha levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. *Cytokine* 72, 43-47 (2015).

- 57 da Silva, R. R. *et al.* Evaluation of Th17 related cytokines associated with clinical and laboratorial parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine* 65, 143-147 (2014).
- 58 Cerqueira, B. A., Boas, W. V., Zanette, A. D., Reis, M. G. & Goncalves, M. S. Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. *Cytokine* 56, 471-476 (2011).
- 59 Dutra, F. F. & Bozza, M. T. Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol* 5, 115 (2014).
- 60 Figueiredo, R. T. *et al.* Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 282, 20221-20229 (2007).
- 61 Lien, E. & Ingalls, R. R. Toll-like receptors. *Crit Care Med* 30, S1-11 (2002).
- 62 Ghosh, S. *et al.* Extracellular hemin crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice. *J Clin Invest* 123, 4809-4820 (2013).
- 63 Belcher, J. D. *et al.* Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood* 123, 377-390 (2014).
- 64 Dutra, F. F. *et al.* Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E4110-4118 (2014).
- 65 Balla, J. *et al.* Heme, heme oxygenase, and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron-rich environment. *Antioxid Redox Signal* 9, 2119-2137 (2007).
- 66 Gozzelino, R., Jeney, V. & Soares, M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50, 323-354 (2010).
- 67 Turhan, A., Weiss, L. A., Mohandas, N., Collier, B. S. & Frenette, P. S. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3047-3051 (2002).

- 68 Mockesch, B. *et al.* Association between oxidative stress and vascular reactivity in children with sickle cell anaemia and sickle haemoglobin C disease. *Br J Haematol* 178, 468-475 (2017).
- 69 Reiter, C. D. *et al.* Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 8, 1383-1389 (2002).
- 70 Michel, M. *et al.* Characteristics and outcome of connective tissue diseases in patients with sickle-cell disease: report of 30 cases. *Semin Arthritis Rheum* 38, 228-240 (2008).
- 71 Steinberg, M. H. Pneumococcus and sickle cell disease: the beginning of the end? *Clin Infect Dis* 44, 1434-1435 (2007).
- 72 Wong, W. Y., Overturf, G. D. & Powars, D. R. Infection caused by *Streptococcus pneumoniae* in children with sickle cell disease: epidemiology, immunologic mechanisms, prophylaxis, and vaccination. *Clin Infect Dis* 14, 1124-1136 (1992).
- 73 Elbashier, A. M., Al-Salem, A. H. & Aljama, A. *Salmonella* as a causative organism of various infections in patients with sickle cell disease. *Ann Saudi Med* 23, 358-362 (2003).
- 74 Ramakrishnan, M. *et al.* Increased risk of invasive bacterial infections in African people with sickle-cell disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 10, 329-337 (2010).
- 75 Makis, A. C., Hatzimichael, E. C. & Bourantas, K. L. The role of cytokines in sickle cell disease. *Ann Hematol* 79, 407-413 (2000).
- 76 Nickel, R. S. *et al.* Immunophenotypic parameters and RBC alloimmunization in children with sickle cell disease on chronic transfusion. *Am J Hematol* 90, 1135-1141 (2015).
- 77 Raghupathy, R. *et al.* Th1 and Th2 cytokine profiles in sickle cell disease. *Acta Haematol* 103, 197-202 (2000).
- 78 Bao, W. *et al.* Immune regulation in chronically transfused allo-antibody responder and nonresponder patients with sickle cell disease and beta-thalassemia major. *Am J Hematol* 86, 1001-1006 (2011).

- 79 Bao, W. *et al.* Regulatory B-cell compartment in transfused alloimmunized and non-alloimmunized patients with sickle cell disease. *Am J Hematol* 88, 736-740 (2013).
- 80 Vingert, B. *et al.* Partial dysfunction of Treg activation in sickle cell disease. *Am J Hematol* 89, 261-266 (2014).
- 81 Godefroy, E. *et al.* Altered heme-mediated modulation of dendritic cell function in sickle cell alloimmunization. *Haematologica* 101, 1028-1038 (2016).
- 82 Lederman, H. M. *et al.* Immunologic effects of hydroxyurea in sickle cell anemia. *Pediatrics* 134, 686-695 (2014).
- 83 Abraham, A., Jacobsohn, D. A. & Bollard, C. M. Cellular therapy for sickle cell disease. *Cytotherapy* 18, 1360-1369 (2016).
- 84 Lanzkron, S., Carroll, C. P. & Haywood, C., Jr. Mortality rates and age at death from sickle cell disease: U.S., 1979-2005. *Public Health Rep* 128, 110-116 (2013).
- 85 Quinn, C. T., Rogers, Z. R. & Buchanan, G. R. Survival of children with sickle cell disease. *Blood* 103, 4023-4027 (2004).
- 86 (ed Ministério da Saúde) (Diario Oficial da União, 2015).
- 87 Hanft, V. N. *et al.* Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. *Blood* 95, 3589-3593 (2000).
- 88 Singh, A. & Xu, Y. J. The Cell Killing Mechanisms of Hydroxyurea. *Genes (Basel)* 7 (2016).
- 89 Cannas, G., Poutrel, S. & Thomas, X. Hydroxycarbamine: from an Old Drug Used in Malignant Hemopathies to a Current Standard in Sickle Cell Disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 9, e2017015 (2017).
- 90 Rees, D. C. The rationale for using hydroxycarbamide in the treatment of sickle cell disease. *Haematologica* 96, 488-491 (2011).
- 91 Platt, O. S. *et al.* Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. *J Clin Invest* 74, 652-656 (1984).

- 92 Perrine, S. P. Fetal globin stimulant therapies in the beta-hemoglobinopathies: principles and current potential. *Pediatr Ann* 37, 339-346 (2008).
- 93 Platt, O. S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *N Engl J Med* 358, 1362-1369 (2008).
- 94 Telen, M. J. Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease. *Blood* 127, 810-819 (2016).
- 95 King, S. B. Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Radic Biol Med* 37, 737-744 (2004).
- 96 Steinberg, M. H. *et al.* Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. Multicenter Study of Hydroxyurea. *Blood* 89, 1078-1088 (1997).
- 97 Charache, S. *et al.* Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med* 332, 1317-1322 (1995).
- 98 Field, J. J. & Nathan, D. G. Advances in sickle cell therapies in the hydroxyurea era. *Mol Med* 20 Suppl 1, S37-42 (2014).
- 99 Green, N. S. & Barral, S. Emerging science of hydroxyurea therapy for pediatric sickle cell disease. *Pediatr Res* 75, 196-204 (2014).
- 100 Brawley, O. W. *et al.* National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: hydroxyurea treatment for sickle cell disease. *Ann Intern Med* 148, 932-938 (2008).
- 101 Davis, B. A. *et al.* Guidelines on red cell transfusion in sickle cell disease. Part I: principles and laboratory aspects. *Br J Haematol* 176, 179-191 (2017).
- 102 Davis, B. A. *et al.* Guidelines on red cell transfusion in sickle cell disease Part II: indications for transfusion. *Br J Haematol* 176, 192-209 (2017).
- 103 Germain, S. *et al.* [Transfusion in sickle cell anemia]. *Pathol Biol (Paris)* 47, 65-72 (1999).

- 104 Inati, A. *et al.* Transfusion Therapy in Children With Sick Cell Disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 39, 126-132 (2017).
- 105 Chou, S. T. & Fasano, R. M. Management of Patients with Sick Cell Disease Using Transfusion Therapy: Guidelines and Complications. *Hematol Oncol Clin North Am* 30, 591-608 (2016).
- 106 Swerdlow, P. S. Red cell exchange in sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 48-53 (2006).
- 107 McLaughlin, J. F. & Ballas, S. K. High mortality among children with sickle cell anemia and overt stroke who discontinue blood transfusion after transition to an adult program. *Transfusion* 56, 1014-1021 (2016).
- 108 Pandey, S., Cottler-Fox, M. & Drobeni, G. Hemoglobin Variants Acquired Post-Exchange Transfusion in Pediatric Sick Cell Disease (SCD) Patients. *Ann Clin Lab Sci* 45, 627-630 (2015).
- 109 Embury, S. H. in *Cecil tratado de medicina interna* (eds J C Bennett & F Plum) 976-988 (Guanabara Koogan, 1997).
- 110 Reed, W. & Vichinsky, E. P. New considerations in the treatment of sickle cell disease. *Annu Rev Med* 49, 461-474 (1998).
- 111 Jackson, B., Fasano, R. & Roback, J. Current Evidence for the Use of Prophylactic Transfusion to Treat Sick Cell Disease During Pregnancy. *Transfus Med Rev* (2018).
- 112 Aliverti, V., Bonanomi, L. & Giavini, E. Hydroxyurea as a reference standard in teratological screening. Comparison of the embryotoxic and teratogenic effects following single intraperitoneal or repeated oral administrations to pregnant rats. *Arch Toxicol Suppl* 4, 239-247 (1980).
- 113 Benites, B. D. *et al.* The effects of exchange transfusion for prevention of complications during pregnancy of sickle hemoglobin C disease patients. *Transfusion* 56, 119-124 (2016).
- 114 Kherad, O. [Blood transfusion : optimizing the use of a scarce and expensive resource]. *Rev Med Suisse* 13, 276-278 (2017).

- 115 Pierni, F., Barros, G. M. N., Voltarelli, J. C. & Simoes, B. P. Transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) em doenças falciformes. *Rev Bras Hematol Hemoter* 39, 327-330 (2007).
- 116 Devetten, M. & Armitage, J. O. Hematopoietic cell transplantation: progress and obstacles. *Ann Oncol* 18, 1450-1456 (2007).
- 117 Johnson, F. L. *et al.* Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia. *N Engl J Med* 311, 780-783 (1984).
- 118 Parkman, R. The application of bone marrow transplantation to the treatment of genetic diseases. *Science* 232, 1373-1378 (1986).
- 119 Fernandes, Q. Therapeutic strategies in Sickle Cell Anemia: The past present and future. *Life Sci* 178, 100-108 (2017).
- 120 Gluckman, E. *et al.* Sickle cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 129, 1548-1556 (2017).
- 121 Vermynen, C. Hematopoietic stem cell transplantation in sickle cell disease. *Blood Rev* 17, 163-166 (2003).
- 122 Bernaudin, F. *et al.* Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. *Blood* 110, 2749-2756 (2007).
- 123 Linderman, J. K., Brooks, G. A., Rodriguez, R. E. & Dallman, P. R. Maintenance of euglycemia is impaired in gluconeogenesis-inhibited iron-deficient rats at rest and during exercise. *J Nutr* 124, 2131-2138 (1994).
- 124 Walters, M. C. *et al.* Indications and Results of HLA-Identical Sibling Hematopoietic Cell Transplantation for Sickle Cell Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 22, 207-211 (2016).
- 125 Vermynen, C. *et al.* Haematopoietic stem cell transplantation for sickle cell anaemia: the first 50 patients transplanted in Belgium. *Bone Marrow Transplant* 22, 1-6 (1998).
- 126 Walters, M. C. *et al.* Impact of bone marrow transplantation for symptomatic sickle cell disease: an interim report. Multicenter

- investigation of bone marrow transplantation for sickle cell disease. *Blood* 95, 1918-1924 (2000).
- 127 Jarduli, L. R. *Neogênese de células T e B em pacientes com doença falciforme tratados com diferentes modalidades terapêuticas* PhD thesis, Universidade de São Paulo, (2018).
 - 128 Azevedo, J. T. C. *Perfis imunológico e hematológico de pacientes com doença falciforme tratados com transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas* PhD thesis, Universidade de São Paulo, (2018).
 - 129 Green, L. C., Tannenbaum, S. R. & Goldman, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* 212, 56-58 (1981).
 - 130 Shannon, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13, 2498-2504 (2003).
 - 131 Taylor, R. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. *Journal of Diagnostic Medical Sonography* 6, 35-39 (1990).
 - 132 Vitelli-Avelar, D. M. *et al.* Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol* 68, 516-525 (2008).
 - 133 Coelho-dos-Reis, J. G. *et al.* Immunological profile of HTLV-1-infected patients associated with infectious or autoimmune dermatological disorders. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2328 (2013).
 - 134 Guimaraes, A. G. *et al.* CD11c+CD123Low dendritic cell subset and the triad TNF-alpha/IL-17A/IFN-gamma integrate mucosal and peripheral cellular responses in HIV patients with high-grade anal intraepithelial neoplasia: a systems biology approach. *J Acquir Immune Defic Syndr* 68, 112-122 (2015).
 - 135 Kaul, D. K. *et al.* Monoclonal antibodies to alphaVbeta3 (7E3 and LM609) inhibit sickle red blood cell-endothelium interactions induced by platelet-activating factor. *Blood* 95, 368-374 (2000).
 - 136 Setty, B. N. & Stuart, M. J. Vascular cell adhesion molecule-1 is involved in mediating hypoxia-induced sickle red blood cell adherence to

- endothelium: potential role in sickle cell disease. *Blood* 88, 2311-2320 (1996).
- 137 Hines, P. C. *et al.* Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of BCAM/Lu-dependent sickle (SS) RBC adhesion. *Blood* 101, 3281-3287 (2003).
 - 138 Perelman, N. *et al.* Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity. *Blood* 102, 1506-1514 (2003).
 - 139 Okpala, I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease - a red cell disorder. *Blood Rev* 18, 65-73 (2004).
 - 140 Jimenez, J. A., Daminano, A., Fernandez, E., Rodriguez-Rubio, F. & Garrido, M. Metabolic alkalosis in diabetic ketosis. *JAMA* 233, 1193-1194 (1975).
 - 141 Pepinsky, B. *et al.* Structure/function studies on vascular cell adhesion molecule-1. *J Biol Chem* 267, 17820-17826 (1992).
 - 142 Colella, M. P. *et al.* Elevated hypercoagulability markers in hemoglobin SC disease. *Haematologica* 100, 466-471 (2015).
 - 143 Duits, A. J. *et al.* Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. *Clin Immunol Immunopathol* 81, 96-98 (1996).
 - 144 Croizat, H. & Nagel, R. L. Circulating cytokines response and the level of erythropoiesis in sickle cell anemia. *Am J Hematol* 60, 105-115 (1999).
 - 145 Sebastiani, P., Ramoni, M. F., Nolan, V., Baldwin, C. T. & Steinberg, M. H. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. *Nat Genet* 37, 435-440 (2005).
 - 146 Nolan, V. G. *et al.* Estimated glomerular filtration rate in sickle cell anemia is associated with polymorphisms of bone morphogenetic protein receptor 1B. *Am J Hematol* 82, 179-184 (2007).
 - 147 Yang, L. *et al.* IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454, 350-352 (2008).

- 148 Li, N. Platelet-lymphocyte cross-talk. *J Leukoc Biol* 83, 1069-1078 (2008).
- 149 Colella, M. P. *et al.* Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia. *J Thromb Haemost* 10, 1967-1970 (2012).
- 150 Zhou, Z., Behymer, M. & Guchhait, P. Role of extracellular hemoglobin in thrombosis and vascular occlusion in patients with sickle cell anemia. *Anemia* 2011, 918916 (2011).
- 151 Naik, R. P., Streiff, M. B., Haywood, C., Jr., Nelson, J. A. & Lanzkron, S. Venous thromboembolism in adults with sickle cell disease: a serious and under-recognized complication. *Am J Med* 126, 443-449 (2013).
- 152 Naik, R. P., Streiff, M. B. & Lanzkron, S. Sickle cell disease and venous thromboembolism: what the anticoagulation expert needs to know. *J Thromb Thrombolysis* 35, 352-358 (2013).
- 153 Schnog, J. B. *et al.* Protein C and S and inflammation in sickle cell disease. *Am J Hematol* 76, 26-32 (2004).
- 154 Pathare, A., Kindi, S. A., Daar, S. & Dennison, D. Cytokines in sickle cell disease. *Hematology* 8, 329-337 (2003).
- 155 Etzerodt, A. & Moestrup, S. K. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal* 18, 2352-2363 (2013).
- 156 Icer, M. A. & Gezmen-Karadag, M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin Biochem* (2018).
- 157 Liu, S., Qu, X., Liu, F. & Wang, C. Pentraxin 3 as a prognostic biomarker in patients with systemic inflammation or infection. *Mediators Inflamm* 2014, 421429 (2014).
- 158 Vincent, F. B., Morand, E. F., Schneider, P. & Mackay, F. The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* 10, 365-373 (2014).

- 159 Fortes, G. B. *et al.* Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production. *Blood* 119, 2368-2375 (2012).
- 160 Langat, D. L., Wheaton, D. A., Platt, J. S., Sifers, T. & Hunt, J. S. Signaling pathways for B cell-activating factor (BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL) in human placenta. *Am J Pathol* 172, 1303-1311 (2008).
- 161 Mackay, F. & Ambrose, C. The TNF family members BAFF and APRIL: the growing complexity. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 311-324 (2003).
- 162 Mackay, F. & Browning, J. L. BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nat Rev Immunol* 2, 465-475 (2002).
- 163 Shu, H. B., Hu, W. H. & Johnson, H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. *J Leukoc Biol* 65, 680-683 (1999).
- 164 Nardelli, B. *et al.* Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood* 97, 198-204 (2001).
- 165 Cheema, G. S., Roschke, V., Hilbert, D. M. & Stohl, W. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 44, 1313-1319 (2001).
- 166 Groom, J. *et al.* Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. *J Clin Invest* 109, 59-68 (2002).
- 167 Mackay, F. & Mackay, C. R. The role of BAFF in B-cell maturation, T-cell activation and autoimmunity. *Trends Immunol* 23, 113-115 (2002).
- 168 Pitanga, T. N. *et al.* Sick red cells as danger signals on proinflammatory gene expression, leukotriene B4 and interleukin-1 beta production in peripheral blood mononuclear cell. *Cytokine* 83, 75-84 (2016).
- 169 Nakanishi, K. Unique Action of Interleukin-18 on T Cells and Other Immune Cells. *Front Immunol* 9, 763 (2018).

- 170 Kaplanski, G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunol Rev* 281, 138-153 (2018).
- 171 Duarte, J. D. *et al.* Genome-Wide Analysis Identifies IL-18 and FUCA2 as Novel Genes Associated with Diastolic Function in African Americans with Sickle Cell Disease. *PLoS One* 11, e0163013 (2016).
- 172 Alagbe, A. E. *et al.* Interleukin-27 and interleukin-37 are elevated in sickle cell anemia patients and inhibit in vitro secretion of interleukin-8 in neutrophils and monocytes. *Cytokine* 107, 85-92 (2018).
- 173 Aparicio-Siegmund, S. & Garbers, C. The biology of interleukin-27 reveals unique pro- and anti-inflammatory functions in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 26, 579-586 (2015).
- 174 Peng, J. *et al.* IL-23 and IL-27 Levels in Serum are Associated with the Process and the Recovery of Guillain-Barre Syndrome. *Sci Rep* 8, 2824 (2018).
- 175 Carriere, V. *et al.* IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 282-287 (2007).
- 176 Wei, J. *et al.* Red Blood Cells Store and Release Interleukin-33. *J Investig Med* 63, 806-810 (2015).
- 177 Nomura, K. *et al.* Regulation of interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin in human nasal fibroblasts by proinflammatory cytokines. *Laryngoscope* 122, 1185-1192 (2012).
- 178 Pollheimer, J. *et al.* Interleukin-33 drives a proinflammatory endothelial activation that selectively targets nonquiescent cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, e47-55 (2013).
- 179 Shao, D. *et al.* Nuclear IL-33 regulates soluble ST2 receptor and IL-6 expression in primary human arterial endothelial cells and is decreased in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 451, 8-14 (2014).

- 180 Aoki, S. *et al.* ST2 gene expression is proliferation-dependent and its ligand, IL-33, induces inflammatory reaction in endothelial cells. *Mol Cell Biochem* 335, 75-81 (2010).
- 181 Taams, L. S. Inflammation and immune resolution. *Clin Exp Immunol* 193, 1-2 (2018).
- 182 Iyamu, E. W. *et al.* Modulation of erythrocyte arginase activity in sickle cell disease patients during hydroxyurea therapy. *Br J Haematol* 131, 389-394 (2005).
- 183 Cacemiro, M. C. *et al.* Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms as disorders marked by cytokine modulation. *Hematol Transfus Cell Ther* 40, 120–131 (2018).
- 184 Chiang, E. Y. & Frenette, P. S. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am* 19, 771-784, v (2005).
- 185 Kutlar, A. Sickle cell disease: a multigenic perspective of a single gene disorder. *Hemoglobin* 31, 209-224 (2007).
- 186 Steinberg, M. H. Genetic modulation of sickle cell anemia. *Proc Soc Exp Biol Med* 209, 1-13 (1995).