PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA CLÍNICA, CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (FMRP-USP)

THALITA CRISTINA DE MELLO COSTA

Avaliação de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial nos períodos pré e pós-transplante de células progenitoras hematopoéticas para tratamento da doença falciforme

Ribeirão Preto

2021

THALITA CRISTINA DE MELLO COSTA

Avaliação de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial nos períodos pré e pós-transplante de células progenitoras hematopoéticas para tratamento da doença falciforme

Versão corrigida

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Células-Tronco e Terapia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Belinda Pinto Simões

Ribeirão Preto

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Thalita Cristina de Mello

Avaliação de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial nos períodos pré e pós-transplante de células progenitoras hematopoéticas para tratamento da doença falciforme. Ribeirão Preto, 2021.

104 p. : il.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Área de concentração: Células-Tronco e Terapia Celular.

Orientadora: Simões, Belinda Pinto.

1. Doença Falciforme. 2. Transplante de células progenitoras hematopoéticas. 3. Endotélio.

Nome: COSTA, Thalita Cristina de Mello

Avaliação de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial nos períodos pré e pós-transplante de células progenitoras hematopoéticas para tratamento da doença falciforme.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Células-Tronco e Terapia Celular

Aprovada em: 22/09/2021

Banca Examinadora

Belinda Pinto Simões Instituição: FMRP-USP

Julgamento: Não Votante

Ana Cristina Silva Pinto Instituição: HCFMRP (FMRP)

Julgamento: Aprovada

Fabíola Traina Instituição: FMRP-USP

Julgamento: Aprovada

Nicola Amanda Conran Zorzetto Instituição: UNICAMP

Julgamento: Aprovada

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com apoio das seguintes instituições:

- Centro de Terapia Celular - CTC-CEPID-FAPESP (número 2013/08135-2)
- "O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001"
- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP)
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

Dedico este trabalho à minha família, que é a base

de todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, João e Raquel, por me ensinarem que somos capazes de alcançar todos os nossos objetivos e de superar todas as adversidades que a vida nos traz, se agirmos com fé, paciência e coragem. Através de seus exemplos e ensinamentos, aprendi que não chegamos a lugar algum sozinhos e que a família é o bem mais precioso que possuímos.

À minha irmã, Thaís, exemplo de determinação; ao meu sobrinho, João Gabriel, que trouxe mais alegria para as nossas vidas; aos meus avós Olga, Jesus, João e Benedita; aos meus tios Roberta, Giovani, Romildo, Luciana, Maria José e Aparecido; ao meu cunhado Miguel; aos meus primos Felipe, Pedro e Frederico, meu sincero agradecimento.

Agradeço imensamente a todos aqueles que fizeram parte deste projeto, ajudando na coleta e no processamento das amostras, contribuindo com sugestões, incentivos ou simplesmente por estarem ao meu lado nessa jornada. Agradeço também aos pacientes que participaram desta pesquisa e aos seus familiares.

Agradeço à professora Belinda Simões, minha orientadora, por acreditar no meu potencial, por me abrir diversas portas, por me mostrar o caminho a ser seguido e por caminhar ao meu lado. Serei eternamente grata por todo o suporte profissional e pessoal, nos momentos de alegria e nos momentos de dificuldade. Levarei sempre seu exemplo de profissionalismo e de amor pelo que faz, além do cuidado com os pacientes e com cada membro da sua equipe.

À Kélen e à Julia, pesquisadoras colaboradoras deste projeto, muito obrigada por estarem presentes desde o planejamento até a discussão dos resultados. Sem vocês nada disso teria acontecido. Levarei sempre comigo o exemplo de dedicação, colaboração e organização que vocês possuem.

Agradeço ao Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e à equipe do transplante de medula óssea, que me acolheu desde 2015 com muito carinho e que considero parte da minha família. Obrigada aos colegas médicos (Dra. Ana Beatriz, Dr. Fabiano, Dr. Guilherme, Dr. Carlos, Dra. Joana, Prof. Renato, Dra. Daniela, Dra. Juliana, Profa. Maria Carolina, Dr. Gil), à equipe de enfermagem (Ana Carolina, Camila, Patrícia, Marianna, Cláudia, Adriano e todos os demais membros da equipe), à equipe multidisciplinar (Karla, Juliana, Ana Luísa, Mariana, Nattália, Juliana Sicchieri, Leandro, Vânia, Denise) e aos funcionários administrativos (Rita, Fabiana e Vera do ambulatório; Joana e Fabiana do laboratório da hematologia). Meu agradecimento especial à Claudia, à Julia e à Marcia, do laboratório da hematologia, responsáveis pelo processamento das amostras deste projeto. Muito obrigada a todos vocês,

pela ajuda na organização, na coleta e no processamento das amostras, assim como pela contribuição com ideias e sugestões, até à finalização desta tese.

Agradeço às equipes da clínica médica e da hematologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto, em especial ao Dr. Jorge Fares, Dr. Jorge Cury, Dr. Carlos Miguel e Dr. Octávio, responsáveis pela minha formação médica, e às minhas orientadoras de iniciação científica durante a graduação, Profa. Patrícia Cury e Profa. Ana Maria Custódio, que me ensinaram conceitos fundamentais do universo das pesquisas.

Agradeço a todos os meus amigos (Maria Carolina, Karla, Ana Luísa, Juliana, Daniela, Thomas, Vanessa, Simone, Sendi, Gabriela, Patrícia, José Eduardo, Laiz, Carlos, Gisele, entre tantos outros) por estarem ao meu lado, compartilhando angústias, dificuldades e conquistas.

Como diria Vinícius de Moraes, “a vida é a arte do encontro, embora haja tanto desencontro pela vida”. Que sorte a minha ter encontrado tantas pessoas especiais nessa vida!

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana seja apenas outra alma humana.”

Carl G. Jung

RESUMO

COSTA, T. C. M. Avaliação de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial nos períodos pré e pós-transplante de células progenitoras hematopoéticas para tratamento da doença falciforme. 2021. 104p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2021.

O transplante de células progenitoras hematopoéticas (TCPH) alogênico é a única opção de tratamento curativo atualmente disponível para pacientes com doença falciforme (DF). A ativação e a disfunção endotelial estão presentes na fisiopatologia da doença e no contexto do TCPH alogênico, como na doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda, complicação deste procedimento. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do TCPH alogênico sobre a função endotelial de pacientes com DF, através da avaliação de marcadores séricos. Vinte e um pacientes com DF, com mediana (variação) de idade de 14 (7-33) anos, submetidos ao TCPH alogênico aparentado HLA idêntico de irmão(ã), foram incluídos no estudo. Os níveis séricos dos marcadores relacionados à ativação endotelial (ICAM-1, VCAM-1, P-selectina, E-selectina, endotelina-1 e VEGF-A), à coagulação (D-dímero, trombomodulina e FvW-A2), à inflamação (IL-6, IL-33, IL-18, IL-6Rα, TNF-α, CD163, pentraxina-3, CXCL4 e TNF-RI) e à DECH (HGF, Reg3A, ST2) foram avaliados nos períodos pré-TCPH, 1 mês, 6 meses e 24 meses pós-TCPH. A análise estatística foi realizada com os testes Mann-Whitney, Fisher, Friedman e Wilcoxon; os valores de $p<0,05$ foram considerados significantes; o método de Kaplan-Meier e o teste log-rank de Mantel foram utilizados na análise das curvas de sobrevida. Todos os pacientes apresentaram enxertia da medula óssea e, durante os primeiros 24 meses pós-TCPH, 10 pacientes desenvolveram DECH aguda e 5 tiveram falha de enxertia secundária. Aos 24 meses pós-TCPH, as medianas (IIQ) dos níveis séricos dos marcadores E-selectina, VCAM-1, endotelina, D-dímero, IL-33, pentraxina-3, IL-18 e HGF foram menores [41,2 (32,6 - 42,6) ng/ml; 927,6 (734,8 - 1346,7) ng/ml; 18,8 (18,3 - 20,2) pg/ml; 3,6 (2,4 - 8,3) µg/ml; 59,6 (50,3 - 66,1) pg/ml; 0,9 (0,7 - 1,1) ng/ml; 187,35 (143,3 - 292,9) pg/ml; 170,8 (137,7 – 232,7) pg/ml; respectivamente] do que as dos níveis séricos do período pré-transplante [57,1 (41,9 – 77,7) ng/ml, p=0,015; 2.667,4 (1507 – 3.832,4) ng/ml, p=0,001; 19,9 (19 – 21,8) pg/ml, p=0,010; 8,3 (7,1 – 13,8) µg/ml, p=0,005; 71,2 (58,1 – 78,7) pg/ml, p=0,013; 1,3 (1 – 1,6) ng/ml, p=0,014; 523,9 (379,6 – 792,8) pg/ml, p=0,002); 249,3 (196 – 382,7) pg/ml, p=0,002, respectivamente], nos pacientes que mantiveram o enxerto funcionante. Os pacientes que mantiveram o enxerto funcionante e desenvolveram DECH aguda tiveram aumento dos níveis séricos do marcador Reg3A nos períodos pré-TCPH e 24 meses pós-transplante, em relação aos pacientes com enxerto funcionante que não tiveram esta complicação. No grupo de pacientes com enxerto funcionante, após 24 meses do transplante, os níveis séricos dos marcadores IL-6, HGF, D-dímero e P-selectina foram maiores nos pacientes com incompatibilidade ABO menor e bidirecional, em relação aos pacientes com incompatibilidade ABO maior e isogrupos com seus doadores. Os pacientes com falha de enxertia secundária apresentaram aumento dos níveis séricos de TNF-α, pentraxina-3, D-dímero, E-selectina, IL-33 e CD163, 24 meses pós-TCPH, em relação aos pacientes com enxerto funcionante. Este estudo demonstrou que o TCPH alogênico aparentado HLA idêntico de irmão(ã) para tratamento da DF reduziu a ativação e a disfunção endotelial, 24 meses pós-TCPH, nos pacientes que mantiveram o enxerto funcionante.

Palavras-chave: Doença falciforme. Transplante de células progenitoras hematopoéticas. Endotélio.

ABSTRACT

COSTA, T. C. M. Evaluation of plasma markers related to endothelial activation and dysfunction before and after hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease. 2021. 104p. Thesis (Doctorate) – Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2021.

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the only curative treatment currently available for patients with sickle cell disease (SCD). Endothelial activation and dysfunction occur as part of SCD pathogenesis and in the context of allogeneic HSCT, including acute graft-versus-host disease (GVHD), a complication of this procedure. The objective of this study was to evaluate the impact of allogeneic HSCT on endothelial function of SCD patients, using plasma markers. Twenty-one patients with SCD, with median age (range) of 14 (7-33) years, submitted to an allogeneic HLA identical sibling HSCT, were included in this study. Plasma markers levels related to endothelial activation (ICAM-1, VCAM-1, P-selectin, E-selectin, endothelin-1 and VEGF-A), coagulation (D-dimer, thrombomodulin and vWF-A2), inflammation (IL-6, IL-33, IL-18, IL-6Rα, TNF-α, CD163, pentraxin-3, CXCL4 and TNF-RI) and acute GVHD (HGF, Reg3A, ST2) were evaluated before, and at 1, 6 and 24 months post-HSCT time points. Statistical data analysis was performed with Mann-Whitney, Fisher, Friedman and Wilcoxon tests; $p<0.05$ values were considered significant; Kaplan-Meier method and Mantel log-rank test were used for survival rates analysis. All patients engrafted, and, during the first 24 months after HSCT, 10 patients developed acute GVHD and 5 had secondary graft failure. At 24 months post-HSCT, median (IIQ) plasma levels of E-selectin, VCAM-1, endothelin-1, D-dimer, IL-33, pentraxin-3, IL-18 and HGF were lower [41.2 (32.6 – 42.6) ng/ml; 927.6 (734.8 – 1346.7) ng/ml; 18.8 (18.3 – 20.2) pg/ml; 3.6 (2.4 – 8.3) µg/ml; 59.6 (50.3 – 66.1) pg/ml; 0.9 (0.7 – 1.1) ng/ml; 187.35 (143.3 – 292.9) pg/ml; 170,8 (137,7 – 232,7) pg/ml; respectively], than in the pre-transplant period [57.1 (41.9 – 77.7) ng/ml, p=0.015; 2,667.4 (1,507 – 3,832.4) ng/ml, p=0.001; 19.9 (19 – 21.8) pg/ml, p=0.010; 8.3 (7.1 – 13.8) µg/ml, p=0.005; 71.2 (58.1 – 78.7) pg/ml, p=0.013; 1.3 (1 – 1.6) ng/ml, p=0.014; 523.9 (379.6 – 792.8) pg/ml, p=0.002); 249.3 (196 – 382.7) pg/ml, p=0.002; respectively], in patients who maintained good graft function. Patients with good graft function and who developed acute GVHD had higher Reg3A levels in the pre-HSCT and 24 months post-transplant periods than patients with good graft function who did not have this complication. In the group of patients with good graft function, 24 months after HSCT, plasma levels of IL-6, HGF, D-dimer and P-selectin were higher in patients with minor and bidirectional ABO incompatibility, compared to patients with major ABO incompatibility and isogroups with their donors. Patients with secondary graft failure had higher plasma levels of TNF-α, pentraxin-3, D-dimer, E-selectin, IL-33 and CD163, 24 months post-HSCT, than patients with good graft function. This study demonstrated that allogeneic HLA identical sibling HSCT for SCD reduced endothelial activation and dysfunction, 24 months after HSCT, in patients who maintained good graft function.

Keywords: Sickle cell disease. Hematopoietic stem cell transplantation. Endothelium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fisiopatologia da doença falciforme 21

Figura 2 - Complicações da doença falciforme e tromboinflamação 22

Figura 3 - Desenho do estudo 35

Figura 4 - Sobrevida global em 24 meses pós-TCPH para tratamento da DF 53

Figura 5 - Sobrevida livre de doença em 24 meses pós-TCPH para tratamento da DF 54

Figura 6 - Sobrevida livre de doença e livre de DECH (GRFS) em 24 meses pós-TCPH para tratamento da DF 55

Figura 7 - Avaliação dos níveis séricos de ICAM-1 (a), VEGF-A (b) e P-selectina (c) nos pacientes com enxerto funcionante (n=16). 62

Figura 8 - Avaliação dos níveis séricos de E-selectina (a), VCAM-1 (b) e endotelina-1 (c) nos pacientes com enxerto funcionante (n=16). 63

Figura 9 - Avaliação dos níveis séricos de IL-33 (a), IL-18 (b) e IL-6Rα (c) nos pacientes com enxerto funcionante (n=16)..... 64

Figura 10 - Avaliação dos níveis séricos de TNF-α (a), CXCL4 (b) e CD163 (c) nos pacientes com enxerto funcionante (n=16)..... 65

Figura 11 - Avaliação dos níveis séricos de TNF-RI (a), pentraxina-3 (b) e IL-6 (c) nos pacientes com enxerto funcionante (n=16). 66

Figura 12 - Avaliação dos níveis séricos de D-dímero (a), trombomodulina (b) e FvW-A2 (c) nos pacientes com enxerto funcionante (n=16). 67

Figura 13 - Avaliação dos níveis séricos de HGF (a), Reg3A (b) e ST2 (c) nos pacientes com enxerto funcionante (n=16)..... 68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial 31

Quadro 2 - Estadiamento e classificação global da DECH aguda (MAGIC). 99

Quadro 3 - Classificação da DECH crônica (NIH 2014). 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características da população do estudo e do TCPH. 388

Tabela 2 - Características clínicas da população do estudo. 39

Tabela 3 - Características do TCPH alogênico aparentado HLA idêntico com condicionamento mieloablativo e fonte de CPH medula óssea da população do estudo. 40

Tabela 4 - Desfechos clínicos individuais nos primeiros 24 meses pós-TCPH. 49

Tabela 5 - Desfechos clínicos nos primeiros 24 meses pós-TCPH. 50

Tabela 6 - Desfechos relacionados à falha de enxertia secundária 50

Tabela 7 - Análise dos marcadores séricos relacionados à doença falciforme pré-TCPH e 24 meses pós-TCPH, nos pacientes com enxerto funcionante. 51

Tabela 8 - Análise de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial antes do TCPH no grupo estudo, de acordo com a idade 57

Tabela 9 - Análise de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial antes do TCPH no grupo estudo, de acordo com a indicação para o procedimento 58

Tabela 10 - Análise de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial no grupo estudo, de acordo com a presença de falha de enxertia ou de enxerto funcionante. 59

Tabela 11 - Análise de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial nos pacientes com enxerto funcionante (n=16). 61

Tabela 12 - Análise de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial, de acordo com a faixa etária, nos pacientes com enxerto funcionante. 70

Tabela 13 - Análise de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial nos pacientes com enxerto funcionante, de acordo com a indicação para o procedimento. 71

Tabela 14 - Análise de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial nos pacientes com enxerto funcionante, de acordo com a presença ou a ausência de DECH aguda. 72

Tabela 15 - Análise de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial nos pacientes com enxerto funcionante, de acordo com a compatibilidade do grupo sanguíneo ABO entre receptor e doador. 73

Tabela 16 - Marcadores séricos relacionados à doença falciforme nos períodos pré-TCPH e 24 meses pós-TCPH, no grupo estudo. 104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATG	Timoglobulina (do inglês *anti-thymocyte globulin*)
AVE	Acidente vascular encefálico
CSA	Ciclosporina
CD163	Agrupamento de diferenciação 163 (do inglês, *cluster of differentiation 163*)
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CPH	Célula progenitora hematopoética
CVM	Citomegalovírus
CNT	Células nucleadas totais
CVO	Crise vaso-oclusiva
CXCL4	Motivo C-X-C ligante de quimiocina 4 (do inglês*, C-X-C motif chemokine ligand 4*)
CY	Ciclofosfamida (do inglês*, cyclophosphamide*)
DF	Doença falciforme
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DHL	Desidrogenase lática
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*)
FDA	Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (do inglês, *Food and Drug Administration*)
FLU	Fludarabina
FvW	Fator de von Willebrand
GRFS	Sobrevida livre de doença e de DECH (do inglês, *graft-versus-host disease-free, relapse-free survival*)
Hb	Hemoglobina
HbAS	Traço falciforme
HbS	Hemoglobina S
HbSS	Anemia falciforme

HbSC	Hemoglobinopatia SC
HbSβ	Sβ-talassemia
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês, *human leukocyte antigen*)
HGF	Fator de crescimento de hepatócito (do inglês, *hepatocyte growth factor*)
HU	Hidroxiureia
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1 (do inglês, *intercellular adhesion molecule 1*)
IIQ	Intervalo interquartil
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-6Rα	Receptor alfa de interleucina 6
IL-18	Interleucina 18
IL-33	Interleucina 33
ILD	Infusão de linfócito do doador
MAGIC	Consórcio internacional de DECH aguda de Monte Sinai (do inglês*, Mount Sinai Acute Graft Versus Host Disease International Consortium*)
MTX	Metotrexato
NIH	Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (do inglês, *National Institute of Health*)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)
Reg3A	Proteína derivada de ilha regenerativa 3 alfa (do inglês, *regenerating islet-derived protein 3 alpha*)
STA	Síndrome torácica aguda
STOP	Estudo clínico de prevenção de acidente vascular encefálico em anemia falciforme (do inglês, *Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia*)
ST2	Supressor de tumorigenicidade-2 (do inglês*, supressor of tumorigenicity-2*)
SUS	Sistema Único de Saúde Brasileiro

SWiTCH	Estudo clínico de avaliação de acidente vascular encefálico com a troca de transfusões para hidroxiureia (do inglês, *Stroke With Transfusions Changing to Hydroxyurea*)
TCPH	Transplante de células progenitoras hematopoéticas
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa (do inglês, *tumor necrosis factor-alpha*)
TNF-RI	Receptor I do fator de necrose tumoral (do inglês *receptor I of tumor necrosis factor*)
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1 (do inglês, *vascular cell adhesion protein 1*)
VEGF-A	Fator de crescimento vascular endotelial-A (do inglês, v*ascular endothelial growth factor A*)
VNTR	Repetição em tandem de numeração variável (do inglês, *variable number tandem repeat*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

1.1 Definição, epidemiologia e diagnóstico da doença falciforme 19

1.2 Fisiopatologia da doença falciforme 19

1.3 Quadro clínico da doença falciforme 21

1.4 Tratamento da doença falciforme 23

1.5 Transplante de células progenitoras hematopoéticas para tratamento da doença falciforme 25

1.6 O endotélio no transplante de células progenitoras hematopoéticas para tratamento da doença falciforme 28

2 JUSTIFICATIVA 32

3 OBJETIVOS 333

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS 34

4.1 Tipo do estudo 34

4.2 Critérios de inclusão e de exclusão 34

4.3 Desenho do estudo 34

4.4 Aprovação do estudo em comitê de ética em pesquisa 35

4.5 Características da população do estudo e do transplante de células progenitoras hematopoéticas 36

4.6 Acompanhamento durante e após o transplante de células progenitoras hematopoéticas 40

4.7 Avaliação de marcadores relacionados à doença falciforme e de quimerismo 43

4.8 Quantificação de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial 43

4.9 Análise Estatística 45

5 RESULTADOS 46

5.1 Desfechos clínicos 46

5.2 Avaliação de marcadores de hemólise e de hemoglobina S nos pacientes com enxerto funcionante 51

5.3 Análise de sobrevida 51

5.4 Avaliação de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial após o transplante de células progenitoras hematopoétitcas 56

5.5 Avaliação de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial nos pacientes com enxerto funcionante..... 60

6 DISCUSSÃO.....74

7 CONCLUSÃO 78

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 79

ANEXOS 92

ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa..... 92

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido para adultos 93

ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido para crianças 95

ANEXO D – Termo de assentimento..... 97

ANEXO E – Classificação da doença do enxerto contra o hospedeiro aguda e crônica..... 99

APÊNDICES.....103

APÊNDICE A – Programação do transplante de células progenitoras hematopoéticas alogênico para tratamento da doença falciforme..... 103

APÊNDICE B – Avaliação individual dos marcadores relacionados à doença falciforme . 104

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição, epidemiologia e diagnóstico da doença falciforme

A doença falciforme (DF) é uma das doenças hereditárias mais prevalentes no mundo, com aproximadamente 13 milhões de pessoas acometidas (PIEL *et al.*, 2017). O Brasil tem aproximadamente 45.000 pessoas com a doença e aproximadamente 7 milhões com o traço falciforme (KELLY *et al.*, 2020). Mais de 300.000 crianças nascem por ano com DF no mundo todo, estando a maioria delas na África subsaariana (KATO *et al*., 2019; PIEL *et al*., 2017). Aproximadamente 3.500 crianças nascem por ano com a doença no Brasil (CARNEIRO-PROIETTI *et al.*, 2018; KELLY *et al.*, 2020), apresentando diferenças em sua prevalência de acordo com as regiões do país (CANÇADO; JESUS, 2007).

A DF, cuja primeira descrição foi feita em 1904, é uma hemoglobinopatia autossômica recessiva causada por um defeito estrutural na síntese da hemoglobina (Hb), em que ocorre uma mutação única na posição número 6 da cadeia da beta-globina, com a substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina, levando à produção de uma Hb anormal chamada hemoglobina S (HbS), que se polimeriza quando desoxigenada e induz alterações na forma e nas propriedades das hemácias (CONRAN; DE PAULA, 2020; KAUL; FABRY; NAGEL, 1989; NADER; ROMANA; CONNES, 2020).

Os indivíduos com DF herdam uma mutação materna e outra paterna. Essas mutações podem ocorrer em estado homozigótico, denominado anemia falciforme (HbSS), ou heterozigótico, caracterizado por herança de HbS em combinação com outro defeito da Hb. (PLATT *et al.*, 2000; SCHECHTER, 2008; ZAGO; PINTO, 2007). A DF, portanto, inclui não apenas a anemia falciforme, mas também doenças com associação de alterações da Hb, como hemoglobinopatia SC (HbSC) ou Sβ-talassemia (HbSβ) (CONRAN; DE PAULA, 2020; PIEL *et al.*, 2013). A eletroforese por focalização isoelétrica e a cromatografia líquida de alta resolução são utilizadas para o diagnóstico da DF, detectando bandas ou picos de HbS (BRASIL, 2017).

1.2 Fisiopatologia da doença falciforme

A DF é caracterizada por anemia hemolítica, eventos vaso-oclusivos, dano endotelial e inflamação crônica (CONRAN; DE PAULA, 2020; NUR *et al.*, 2011). A HbS

polimerizada torna-se insolúvel, alterando a forma de disco bicôncavo da hemácia para uma estrutura em forma de foice, fenômeno conhecido como falcização, ocasionando, assim, a redução da sua deformabilidade (GLADWIN; VICHINSKY, 2008; KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; WOOD; GRANGER, 2007). As hemácias falcizadas são densas, tendem a sofrer desidratação e caracterizam-se por maior adesividade ao endotélio. Também são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio, liberando micropartículas inflamatórias contendo heme, e de ativar a via do complemento. A fragilidade e a rigidez da hemácia fazem com que ela sofra lise tanto no compartimento intra como no extravascular, caracterizando a anemia. Durante a hemólise, a Hb livre reage rapidamente com o óxido nítrico vascular, gerando vasoconstrição, e promove a ativação celular (BELCHER *et al.*, 2014; CONRAN; DE PAULA, 2020; NADER; ROMANA; CONNES, 2020).

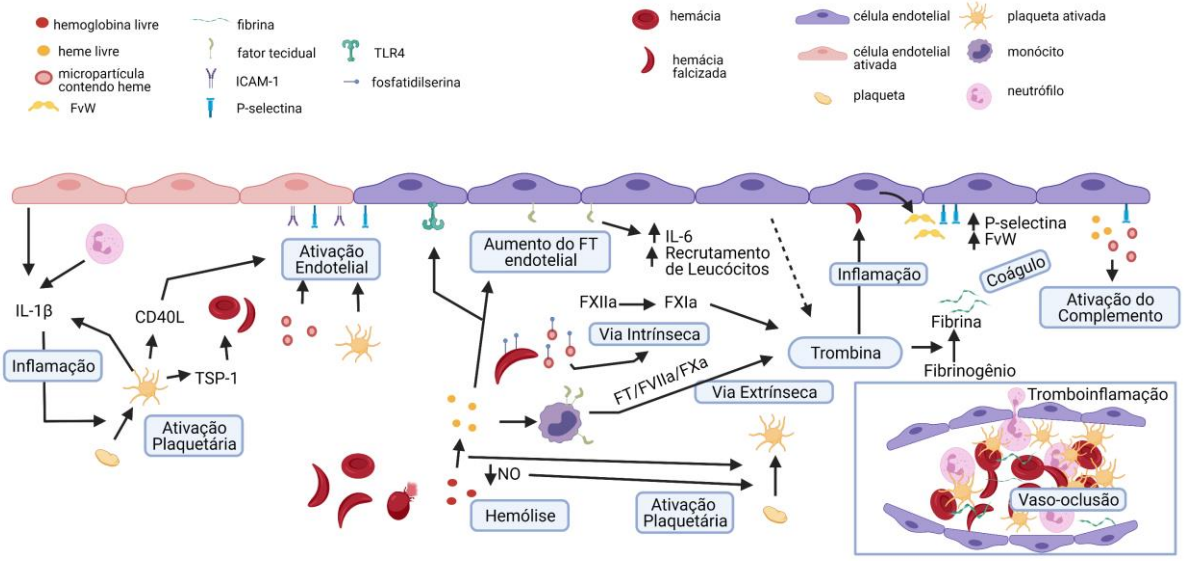
A interrupção da circulação sanguínea na DF, conhecida como vaso-oclusão, ocorre principalmente na microcirculação, em vênulas e arteríolas. A alteração da reologia do sangue (aumento da viscosidade plasmática e redução da deformabilidade da hemácia), os processos inflamatórios estéreis ou induzidos por patógenos, a ativação endotelial e o recrutamento de diferentes células (leucócitos, plaquetas e hemácias) estão implicados na fisiopatologia desta complicação (BENNEWITZ *et al.*, 2017; NADER *et al.*, 2020; SUNDD *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2016).

As respostas inflamatórias estéreis são caracterizadas pela presença de grande número de moléculas inflamatórias, produzidas pelo resultado da hemólise e dos eventos de isquemia-reperfusão. Este processo leva à produção de alarminas, como a interleucina 33 (IL-33), que são moléculas que amplificam os mecanismos inflamatórios por meio da ligação e da ativação de receptores encontrados em diferentes células. As respostas não estéreis podem ser causadas por bactérias e pela microbiota intestinal, devido à ativação celular e ao aumento da translocação de bactérias do intestino para o sangue (BATTERSBY; KNOX-MACAULAY; CARROL, 2010; ZHANG *et al.*, 2016).

O equilíbrio hemostático está claramente inclinado para um estado protrombótico na DF, sendo identificado o aumento de níveis séricos de complexos trombina-antitrombina, D-dímero, fragmento de protrombina 1.2, fator VIII, fibrinogênio e de fator de von Willebrand (FvW). Ocorre também a ativação do sistema complemento durante a hemólise das hemácias falcizadas (CONRAN; DE PAULA, 2020). O aumento da expressão de P-selectina pelas

plaquetas e o aumento da adesão e da agregação plaquetária também estão relacionados ao estado de hipercoagulabilidade da DF (ATAGA; KEY, 2007) (Figura 1).

Figura 1 - Fisiopatologia da doença falciforme



A formação de agregados heterocelulares com trama de eritrócitos, resultando em processos vaso-oclusivos, a inflamação e a ativação da coagulação caracterizam a doença falciforme. ICAM-1: molécula de adesão intercelular-I; IL: interleucina; NO: óxido nítrico; FT: fator tecidual; TLR4: receptor *toll-like* 4; FvW: fator de von Willebrand. Fonte: adaptação de Conran e De Paula, (2020). Figura criada com BioRender.com

1.3 Quadro clínico da doença falciforme

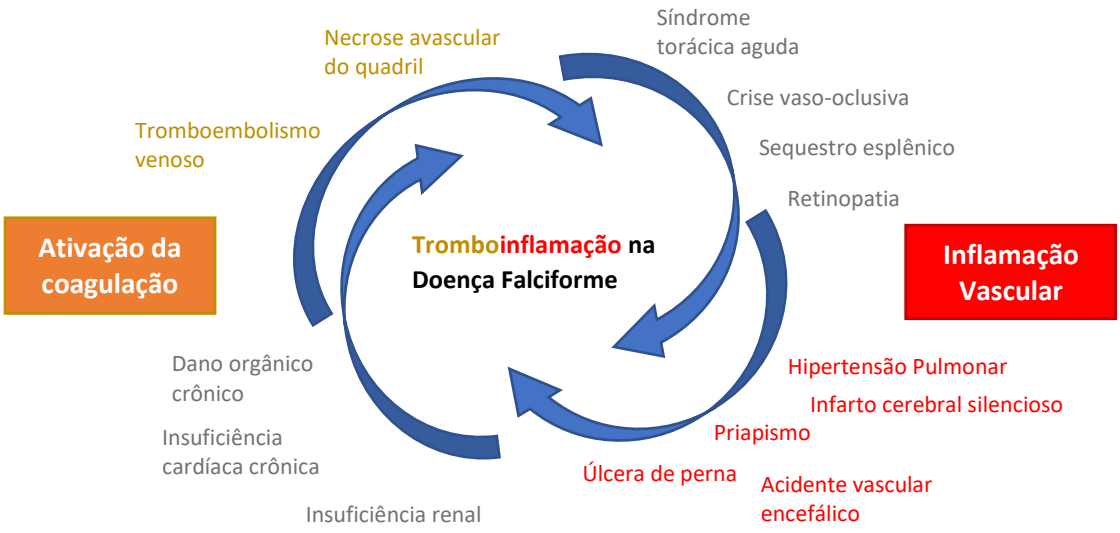
A DF é caracterizada por complicações agudas e crônicas, como a crise vaso-oclusiva (CVO), o priapismo, a síndrome torácica aguda (STA), o acidente vascular encefálico (AVE), a hipertensão pulmonar, a insuficiência renal, entre outras (KATO *et al.*, 2019).

A CVO é a complicação aguda mais frequente em pacientes com DF, sendo responsável pela maioria das admissões hospitalares relacionadas à doença. Ela manifesta-se como dor visceral e/ou musculoesquelética, que frequentemente necessita de internação hospitalar, hidratação venosa e uso de opioides. Está associada a complicações graves como a STA, o AVE, a falência de múltiplos órgãos e a morte súbita (NUR *et al.*, 2011). O aparecimento da dor crônica ocorre com o aumento da idade e tem sido estimado em 30% a 40% dos adolescentes e adultos com DF (BRANDOW *et al.*, 2020).

Aproximadamente 11% dos indivíduos com DF apresentam AVE, principal morbidade relacionada à doença, até a idade de 20 anos. Crianças com risco para o desenvolvimento de AVE secundário à DF podem ser identificadas pela anormalidade da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral na ultrassonografia transcraniana com doppler (fluxo > 200 cm/segundo) (ZHENG; CHOU, 2021). No AVE isquêmico ocorre a aceleração da formação de trombo na vasculatura cerebral causada pela ativação do endotélio e de neutrófilos, além de ocorrer o aumento de L-selectina e de interleucina-6 (IL-6), a perda da regulação vascular e a hiperplasia da íntima dos vasos (ASARE *et al.*, 2010; GAVINS *et al.*, 2011).

Em resumo, a DF é caracterizada por um círculo vicioso entre a reologia anormal da hemácia, a hemólise, a ativação endotelial, o recrutamento de diferentes células, a ativação da coagulação e a inflamação, que modulam a gravidade clínica da doença (Figura 2).

Figura 2 - Complicações da doença falciforme e tromboinflamação



A tromboinflamação pode ser vista como uma resposta a patógenos ou ao dano tecidual, na qual a ativação da coagulação e a ativação localizada das vias de inflamação na microcirculação (inflamação vascular) atuam em conjunto para facilitar o reparo tecidual ou a eliminação do patógeno. A ativação desregulada leva a diferentes padrões de complicações, sendo algumas delas mais relacionadas à ativação da coagulação e outras à inflamação vascular. Em algumas, porém, não é possível identificar precisamente sua localização no círculo vicioso da fisiopatologia da DF. Fonte: adaptação de Conran e De Paula (2020).

1.4 Tratamento da doença falciforme

O tratamento convencional da DF consiste em medidas para prevenir infecções, como a vacinação contra bactérias encapsuladas e o uso de penicilina; o uso de hidroxiureia (HU) e a transfusão de concentrados de hemácias para prevenir ou tratar complicações como o AVE, a STA e a CVO (CHOU; FASANO, 2016; REES *et al.*, 2018). Apesar do progresso significativo no seu manejo, a DF permanece com um alto risco de morbidade e mortalidade precoces (BERNAUDIN *et al.*,2020).

A terapia mais utilizada na DF é a HU, que atua na inibição da enzima ribonucleotídeo redutase, levando a um aumento na produção da hemoglobina fetal, da hidratação do glóbulo vermelho e dos níveis de Hb, além de resultar em diminuição da hemólise, aumento da produção de óxido nítrico e diminuição da expressão de moléculas de adesão. Até o momento, a HU é considerada a terapia medicamentosa mais eficaz na DF (LANZKRON *et al.*, 2008; PLATT, 2008; VICARI; BARRETTO DE MELLO; FIGUEIREDO, 2005), sendo a única terapia oferecida pelo Sistema Único de Saúde brasileiro (SUS). Além da redução da incidência de hospitalização e de dor aguda, a HU reduz a ocorrência de STA e pode ser uma alternativa à terapia de transfusão crônica em alguns pacientes, indicando benefícios nos mecanismos hemostáticos e tromboinflamatórios, que contribuem para essas complicações. A associação do uso de HU com a redução dos níveis de marcadores de hipercoagulabilidade na DF tem sido descrita, porém, seus efeitos na concentração sérica de algumas moléculas pró-inflamatórias são menos claros (CONRAN; DE PAULA, 2020). Apesar dos resultados satisfatórios em relação à CVO e à hemólise, a HU teve resultados inferiores à transfusão crônica na profilaxia secundária de AVE, contando com 19% de recorrência do evento em pacientes com história prévia de AVE em uso de HU (BERNAUDIN *et al.,* 2020).

A transfusão aguda esporádica é indicada para o manejo da anemia sintomática, da STA, do AVE, do sequestro esplênico e no período perioperatório. A transfusão crônica é utilizada para a prevenção primária e secundária de AVE e para a prevenção de algumas manifestações crônicas da doença (ZHENG *et al.*, 2021). Aproximadamente 10% dos pacientes com DF em países desenvolvidos estão em regime de transfusão crônica (KATO *et al.*, 2019). Complicações relacionadas às transfusões são frequentes, como a aloimunização contra antígenos eritrocitários, a sobrecarga de ferro e a transmissão de

infecções, como hepatite B e C, entre outras (PORTER; GARBOWSKI, 2013; YAZDANBAKHSH *et al.*, 2012). A aloimunização contra antígenos eritrocitários tem um impacto direto na transfusão dos concentrados de hemácias, em relação à identificação de unidades compatíveis (COLEMAN *et al.*, 2019). Os pacientes aloimunizados tiveram uma alta prevalência de dor crônica, osteonecrose e aproximadamente dez anos a menos na expectativa de vida, em relação aos pacientes não aloimunizados (54 e 65 anos de idade, respectivamente) (TELEN *et al.*, 2015).

A transfusão crônica para manter a HbS menor do que 30% e a Hb entre 9 g/dL e 11 g/dL permite a redução do risco de recorrência de AVE isquêmico de 67% para 10-20%. Entretanto, se a transfusão crônica for interrompida, o risco de recorrência é de aproximadamente 50%. O estudo STOP (*Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia*) comparou a transfusão crônica com a observação na prevenção primária de AVE. Foi definido como critério para início da terapia transfusional crônica em pacientes de alto risco a velocidade do fluxo cerebral >200 cm/segundo. O estudo demonstrou que a transfusão crônica reduziu em 92% o risco de AVE (BERNAUDIN *et al.*, 2020). Os estudos STOP II e SWiTCH (*Stroke With Transfusions Changing to Hydroxyurea*) demonstraram que a suspensão das transfusões está associada a um risco aumentado de ocorrência de novos eventos neurológicos ou à alteração do doppler transcraniano (ABBOUD *et al.,* 2011; WARE; HELMS, 2012).

Existem novas opções de tratamento para a DF, que permitem o aumento da afinidade da Hb por oxigênio; a inibição de E-selectina e de P-selectina; a inibição da adesão da hemácia ao endotélio; a modulação da inflamação; a interação entre neutrófilos e plaquetas; e a inibição plaquetária (TELEN, 2016). Atualmente, quatro drogas foram aprovadas pela Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA) para tratamento de crianças e adultos com DF (hidroxiureia, L-glutamina, voxelotor e crizanlizumabe), reduzindo a taxa de episódios de dor aguda tratadas em emergências ou em internações (BRANDOW *et al.*, 2020; OSUNKWO; MANWANI; KANTER, 2020). O crizanlizumabe, avaliado no estudo fase II SUSTAIN (ATAGA *et al.*, 2017), é um tratamento anti-P-selectina, capaz não apenas de diminuir a receptividade endotelial à adesão de leucócitos, mas também reduzir a participação de plaquetas na formação de agregados celulares (CONRAN; DE PAULA, 2020).

Apesar dos avanços no tratamento da DF, a mortalidade relacionada à doença permanece elevada. No Brasil, um total de 9817 óbitos relacionados à doença falciforme ocorreram entre os anos de 2000 e 2018, sendo que 70,5% deles tiveram a doença falciforme como causa do óbito e 29,5% como causa associada (SANTO, 2020). A taxa de mortalidade global no estado do Rio de Janeiro em menores de 18 anos e em maiores de 18 anos foi de 16,77%, 10,48% e 18,87%, respectivamente, em um estudo com 1.676 pacientes, publicado em 2018. As causas mais comuns de morte pela doença neste estudo foram infecção, STA, AVE, dano orgânico e morte súbita durante a CVO. (LOBO *et al.*, 2018).

Os únicos tratamentos curativos para a DF são o transplante de células progenitoras hematopoéticas (TCPH) alogênico e a terapia gênica. A terapia gênica vem sendo utilizada apenas em pesquisa clínica, enquanto o TCPH alogênico aparentado com antígeno leucocitário humano (HLA) idêntico de irmão(ã) já é bem estabelecido (GLUCKMAN *et al.*, 2017) e é aprovado no Brasil pelo Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2015).

1.5 Transplante de células progenitoras hematopoéticas para tratamento da doença falciforme

O TCPH alogênico é uma opção de tratamento curativo para diversas doenças malignas e não malignas, limitado por complicações potencialmente graves e pela mortalidade relacionada ao procedimento (SUREDA *et al.*, 2015). O objetivo do TCPH alogênico na DF é substituir a medula óssea do paciente, após um regime de condicionamento, por células funcionais de um doador com ou sem traço falciforme, para prevenir complicações e disfunções orgânicas causadas pela doença (BERNAUDIN *et al.*, 2007).

Desde o primeiro relato, em 1984, de um TCPH de sucesso em uma criança com leucemia mieloide aguda e DF, que foi curada de ambas as doenças (JOHNSON *et al.*, 1984), esforços têm sido feitos para tornar esta terapia disponível para os pacientes com DF e, apesar de mais de 1.000 transplantes terem sido realizados no mundo todo com esse objetivo, o número de pacientes transplantados permanece baixo, principalmente em países subdesenvolvidos, onde a incidência da doença é maior (BERNAUDIN *et al.*, 2020).

O TCPH alogênico é um tratamento oferecido para pacientes que apresentam complicações graves da doença ou para aqueles com alto risco de desenvolvê-las (ANGELUCCI *et al.*, 2014; FITZHUGH *et al.*, 2014). De acordo com o consenso da sociedade brasileira de transplante de medula óssea, são candidatos ao TCPH alogênico os pacientes que estão em uso de HU e/ou em regime de transfusão crônica e que apresentam pelo menos uma das seguintes complicações: alteração neurológica devido à AVE, persistindo por mais de 24 horas ou alteração em exame de imagem em sistema nervoso central; doença cerebrovascular associada à DF; dois ou mais episódios de CVO graves (incluindo a STA) no último ano; mais de um episódio de priapismo; presença de mais de um aloanticorpo contra antígenos eritrocitários, em vigência de regime de transfusão crônica; osteonecrose em mais de um sítio (COSTA *et al.*, 2021). Um estudo composto por 2.064 pacientes brasileiros com DF revelou que 16% das crianças e 26% dos adultos tiveram pelo menos uma indicação para o TCPH (FLOR-PARK *et al.*, 2019).

Os pacientes submetidos ao TCPH alogênico aparentado HLA idêntico de irmão(ã) para tratamento da DF têm sobrevida global entre 92% e 94%; sobrevida livre de doença de 80 a 90%; falha de enxertia primária menor do que 10%; mortalidade relacionada ao transplante variando entre 0 e 12%; incidência de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), principal complicação relacionada ao TCPH alogênico, aguda de 10-20% e de DECH crônica inferior a 20% (BERNAUDIN *et al.*, 2007; BRACHET *et al.*, 2004; DALLAS *et al.*, 2013; DEDEKEN *et al.*, 2013; GLUCKMAN *et al.*, 2017; MAKESCHWARI *et al.*, 2014; PANEPINTO *et al.*, 2007; SONI *et al.*, 2014; VERMYLEN *et al.*, 1998; WALTERS *et al.*, 2001). A experiência global em 73 pacientes com história de AVE submetidos ao TCPH HLA idêntico de irmão(ã) demonstrou a ocorrência de 4 eventos de AVE hemorrágicos (5,5%), mas nenhuma recorrência de AVE isquêmico, oferecendo desta maneira excelentes resultados para a prevenção secundária de AVE. Em relação à prevenção primária de AVE, um estudo prospectivo comparou a velocidade do fluxo cerebral no doppler transcraniano após o TCPH alogênico aparentado HLA idêntico de irmão (ã) e após o tratamento com transfusão crônica, por pelo menos um ano, e encontrou velocidades significativamente menores no primeiro e no terceiro ano de seguimento no grupo de pacientes submetidos ao TCPH, com uma diferença de -40 cm/segundo (BERNAUDIN *et al.*, 2020).

Devido às melhores taxas de sobrevida global e de sobrevida livre de evento e às menores incidências de DECH aguda e crônica em pacientes mais jovens, o encaminhamento precoce para o TCPH tem sido recomendado (CAPPELLI *et al.*, 2019). Atualmente, os pacientes com DF sintomática e que tenham um irmão(ã) HLA idêntico devem ser avaliados em relação à indicação ao TCPH (GLUCKMAN *et al.*, 2017).

O TCPH alogênico aparentado HLA idêntico com condicionamento mieloablativo mostrou resultados satisfatórios, sendo os regimes mais utilizados os compostos por bussulfano associado à ciclofosfamida (CY), e bussulfano associado à fludarabina, ambos em associação com a timoglobulina (ATG) (COSTA *et al.*, 2021). É importante destacar que os regimes de condicionamento mieloablativo estão associados à maior morbidade e mortalidade, devido aos riscos de infertilidade, de neoplasia secundária e de complicações orgânicas em pacientes com comprometimento prévio relacionados à DF (BHATIA *et al.*, 2014). A profilaxia de DECH, nesses casos, é realizada com ciclosporina (CSA) e metotrexato (MTX), drogas imunossupressoras (COSTA *et al.*, 2021).

A DECH, classificada em aguda e crônica, é a principal causa de morbidade e mortalidade relacionada ao TCPH alogênico. Trata-se de uma resposta imunológica das células do enxerto (doador) contra antígenos do receptor, levando à inflamação e ao dano a diversos órgãos e sistemas (LEE *et al.*,2017; SUNG *et al.*, 2013). Apesar do tratamento profilático com agentes imunossupressores, 20 a 80% dos receptores de TCPH alogênico desenvolvem DECH (MARTIN *et al.*, 2012). As manifestações da DECH nos pacientes com DF submetidos ao TCPH alogênico são semelhantes às que ocorrem em pacientes com doenças malignas, e a incidência e a gravidade variam de acordo com a fonte de célula progenitora hematopoética (CPH), a compatibilidade HLA e a idade do paciente. Dependendo da gravidade, a DECH pode impactar negativamente a qualidade de vida dos pacientes (SHENOY *et al.*, 2018).

O quimerismo misto, com produção de células do paciente e do doador, é comum após o TCPH alogênico para hemoglobinopatias, provavelmente devido à presença de imunocompetência do receptor (BERNAUDIN *et al.*, 2007; SHENOY *et al.*, 2018; WALTERS *et al.*, 2016). A presença de quimerismo maior do que 25% do doador está associada à resolução dos sintomas da doença e os níveis de HbS nos pacientes transplantados devem ser interpretados no contexto da presença ou não do traço falciforme dos doadores (ABRAHAM *et al.*, 2017), existindo a possibilidade de retorno das manifestação da DF com HbS acima de 50% (SHENOY *et al.*, 2018).

Dificuldades dentro do contexto do TCPH para DF incluem a falha de enxertia, a mortalidade relacionada ao TCPH, o desenvolvimento de DECH e de infertilidade, e a falta de um doador irmão(ã) HLA idêntico (BERNAUDIN *et al.*, 2020). O melhor tratamento para pacientes que não têm um irmão(ã) HLA idêntico ainda é controverso. Diversas propostas são discutidas: doador alternativo, terapia gênica ou novos tratamentos para reduzir os sintomas e complicações da doença. Até o momento, poucas séries de casos de pacientes com DF transplantados com doadores não aparentados e com doadores haploidênticos foram relatados, mas os altos índices de falha de enxertia e de DECH limitam o seu uso (GLUCKMAN *et al.*, 2020).

1.6 O endotélio no transplante de células progenitoras hematopoéticas para tratamento da doença falciforme

O endotélio vascular, camada única de células metabolicamente ativas na parede dos vasos sanguíneos, está presente em todos os tecidos, separando o sangue circulante das demais estruturas (AIRD *et al.*, 2007). Um adulto humano tem uma área de superfície endotelial capaz de cobrir mais de 3.000 metros quadrados, com aproximadamente 1kg e 1 a 6 X 10^{13} células (CINES *et al.*, 1998). O endotélio é considerado um órgão multifuncional, de importância sistêmica, devido ao seu papel na regulação da inflamação, na coagulação, no tônus vasomotor, na permeabilidade do vaso e na angiogênese, além de apresentar funções específicas em diferentes órgãos, com heterogeneidade nos seus perfis de expressão genética. O estímulo do microambiente, como o estresse oxidativo, a hipóxia e a presença de fatores de crescimento específicos estão envolvidos no desenvolvimento das características locais das células endoteliais, como a presença ou a ausência de fenestrações (RICARD *et al.*, 2021).

A ativação endotelial é estimulada por diferentes agentes pró-inflamatórios, como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interação de CD40/CD40 ligante, entre outros (SZMITKO *et al.*, 2003). Após a ativação, ocorre um aumento na expressão de moléculas de adesão celular, da diapedese leucocitária, do tônus vascular e da estimulação à trombogênese (STEYERS; MILLER, 2014). Esta ativação pode ser revertida para o estado basal ou progredir para a disfunção endotelial (AIRD *et al.*, 2007).

Na fisiopatologia da DF, a ativação endotelial aumenta a geração de moléculas pró-inflamatórias e estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a adesão e a captura de hemácias mais adesivas e ativadas, de leucócitos e de plaquetas ao endotélio vascular desencadeia a vaso-oclusão. Células endoteliais também desempenham um papel na geração de moléculas pró-inflamatórias, que estão supra reguladas, incluindo citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, eicosanoides e peptídeos, capazes de estimular as células e induzir a expressão de moléculas de adesão de superfície, levando a um estado inflamatório crônico (CONRAN; DE PAULA, 2020).

A ativação do endotélio, mediada pelo composto heme, induz o estresse oxidativo e resulta na mobilização de FvW e P-selectina para a superfície da célula endotelial. O aumento de moléculas de adesão pode promover o recrutamento de plaquetas e de leucócitos para a parede dos vasos sanguíneos (BELCHER *et al.*, 2014). O marcador CD163 codifica um receptor exclusivo de células da linhagem macrofágica e monocítica, sua produção é controlada por citocinas inflamatórias, como a IL-6 (LAU *et al.*, 2004), e tem a função de remover os complexos hemoglobina-haptoglobina. Em condições elevadas de hemólise, a haptoglobina é rapidamente depletada e o CD163 facilita a retirada da Hb livre e do composto heme (MOLLER *et al.*, 2011).

Citocinas inflamatórias, como o TNF-α e a IL-6, são produzidas por células endoteliais ativadas e desempenham um papel significativo na CVO da DF (BANDEIRA *et al.*, 2014). Outros marcadores relacionados direta ou indiretamente à função endotelial, como o receptor de Interleucina 6 alfa (IL-6Rα), E-selectina, FvW, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), IL-6, interleucina-18 (IL-18), endotelina-1, pentraxina-3, receptor I do fator de necrose tumoral (TNF-RI), fator de crescimento de hepatócito (HGF), D-dímero e trombomodulina têm sido avaliados na DF (ALAGBE; OLANYIY; AWORANTI, 2018; BENKERROU *et al.*, 2002; COLELLA *et al.*, 2012; CONRAN *et al.*, 2004; DAR *et al.*, 2010; DWORKIS *et al.*, 2011; FUKSIEWICZ *et al.*, 2010; GUPTA *et al.*, 2021; HYACINTH *et al.*, 2015; NUR *et al.*, 2011; QARI *et al.*, 2012; SALEH; HILLEN; DUITS, 1999; SZMITKO *et al.*, 2003; ZAHRAN *et al.*, 2020; ZHOU; BEHYMER; GUCHHAIT, 2011).

Durante o TCPH alogênico, as células endoteliais são ativadas, alterando desta maneira seu espectro fenotípico, pelo condicionamento com quimioterapia e/ou radioterapia, por drogas utilizadas após o transplante, como imunossupressores, e

através da translocação de produtos microbianos devido à lesão de mucosas. Quando esse processo é intenso e sustentado ocorre dano endotelial e diversas manifestações clínicas precoces, como síndrome de obstrução sinusoidal, microangiopatia trombótica associada ao transplante, síndrome da fragilidade capilar e DECH aguda (CARRERAS; DIAZ-RICART, 2011).

Estudos demonstram um papel importante do endotélio na fisiopatologia da DECH aguda, na qual as células endoteliais são alvo de linfócitos T alorreativos (CARRERAS; DIAZ-RICART, 2011). A angiogênese parece ser um evento muito precoce durante a DECH aguda, ocorrendo antes da infiltração de células em órgãos-alvo (MERTLITZ *et al.*, 2017). Estudos clínicos demonstraram que marcadores solúveis de dano endotelial, como FvW e trombomodulina, podem ser usados como marcadores durante a DECH aguda. Alterações estruturais, dano extenso e disfunção da vasculatura foram demonstrados em biópsias de pacientes com DECH aguda e em modelos murinos (CORDES *et al.*, 2020). O marcador supressor de tumorigenicidade-2 (ST2) e a proteína derivada de ilha regenerativa 3 alfa (Reg3A) são biomarcadores bem estabelecidos no cenário da DECH aguda, com relevância biológica para o acometimento do trato gastrointestinal. O TNF-RI é produzido por células T e monócitos e amplifica a injúria gastrointestinal (LEVINE *et al.*, 2015). Outros marcadores pró-inflamatórios tiveram níveis séricos aumentados no início das manifestações clínicas da DECH aguda, como HGF e IL-18 (FIEMMA *et al.*, 2012).

Em resumo, o endotélio tem um papel essencial na fisiopatologia da DF e de complicações relacionadas ao TCPH alogênico, como a DECH aguda. Porém, até o momento, não há estudos sobre a avaliação do dano endotelial após o TCPH alogênico para tratamento da DF. Alguns dos marcadores relacionados à ativação endotelial, à inflamação, à coagulação e à DECH aguda, utilizados neste estudo, estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial

Marcador	**Descrição**
Marcadores séricos relacionados à ativação endotelial	
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1; glicoproteína de superfície de células endoteliais vasculares (HUBBARD; ROTHLEIN, 2000).
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1; presente na superfície de células endoteliais (CONRAN *et al.*, 2004).
P-selectina	Molécula de adesão celular; encontrada na superfície de células endoteliais e de plaquetas ativadas. (BLANN et a., 2008).
E-selectina	Molécula de adesão celular; presente nas células endoteliais ativadas (BENKERROU *et al.*, 2002).
endotelina-1	Potente vasoconstritor produzido por células endoteliais vasculares (FOX; KASZTAN, 2016)
VEGF-A	Fator de crescimento vascular endotelial, relacionado à neovascularização (LOPES *et al.*, 2014)
Marcadores séricos relacionados à inflamação	
IL-6	Interleucina 6; citocina inflamatória moduladora da resposta imune, envolvida na patogênese da DECH aguda (GRECO *et al.*, 2019).
IL-33	Interleucina 33; membro da superfamília de citocinas IL-1, que leva à produção de uma variedade de citocinas e contribui para a patogênese de doenças inflamatórias (LIEW; GIRARD; TURNQUIST, 2016).
IL-18	Interleucina 18; citocina pró-inflamatória com efeitos pleiotrópicos diversos (ANYONA *et al.*, 2011).
IL-6Rα	Receptor alfa de IL-6; relacionado à atividade de neutrófilos associada ao endotélio (SALEH; HILLEN; DUITS, 1999)
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa; citocina pró-inflamatória circulante (ZAHRAN *et al.*, 2020).
CD163	Cluster de diferenciação 163; glicoproteína da superfamília de receptor rico em cisteína, que se liga a complexos haptoglobina-hemoglobina do sangue, eliminando-os (LAU *et al.*, 2004).
pentraxina-3	Proteína de fase aguda e componente chave da imunidade inata (NUR *et al.*, 2011).
CXCL-4	Motivo C-X-C ligante de quimiocina 4; secretado por uma variedade de células imunes, como células T ativadas e monócitos. Tem efeitos imunomodulatórios na hematopoiese e angiogênese; está implicado na patologia de doenças inflamatórias (GLEITZ *et al.*, 2020)
TNF-RI	Receptor I de TNF, conhecido como um mediador importante de apoptose celular (FUKSIEWICZ *et al.*, 2010).
Marcadores séricos relacionados à coagulação	
D-dímero	Proteína envolvida na atividade fibrinolítica (TOMER *et al.*, 2001).
Trombomodulina	Proteína encontrada na superfície das células endoteliais, envolvida na ativação da proteína C, um anticoagulante natural (SALAT *et al.*, 1997)
FvW-A2	Fator de von-Willebrand A2; glicoproteína multimérica relacionada à hemostasia (ZHOU *et al.*, 2011)
Marcadores séricos relacionados à DECH aguda	
HGF	Fator de crescimento de hepatócito humano (do inglês, *hepatocyte growth factor*); possui efeitos mitogênicos e morfogênicos em tecidos epiteliais do fígado, do rim, do pulmão e do intestino; apresenta atividade anti-apoptótica e está relacionado à DECH aguda (KUROIWA *et al.*, 2001).
Reg3A	Proteína 3-A derivada de ilha regenerativa (do inglês, *regenerating islet-derived protein 3-A*); reflete o dano à mucosa do trato gastrointestinal baixo; marcador de DECH aguda (MAJOR-MONFRIED *et al.*, 2018).
ST-2	Supressor de tumorigenicidade-2 (do inglês, *supressor of tumorigenicity-2*); reflete o dano à mucosa do trato gastrointestinal baixo, marcador de DECH aguda (MAJOR-MONFRIED *et al.*, 2018).

DECH, doença do enxerto contra o hospedeiro aguda.

2 JUSTIFICATIVA

O endotélio tem sido alvo de estudos no contexto do TCPH alogênico para tratamento de diversas doenças, já que está intimamente ligado a complicações precoces e tardias relacionadas ao procedimento (CARRERAS; DIAZ-RICART, 2011; TICHELLI *et al.*, 2007). Porém, a avaliação quantitativa do dano endotelial e do seu reparo após o TCPH alogênico ainda é pouco explorada, especialmente no cenário da DF.

A compreensão e a identificação precoce das alterações endoteliais durante o TCPH para tratamento da DF, que podem ser secundárias à doença de base e ao transplante, assim como o conhecimento dos resultados que o TCPH pode oferecer, em relação à função endotelial, podem contribuir para o sucesso e avanço deste tratamento.

Diante da complexidade da função endotelial, especialmente no contexto do TCPH para DF, justifica-se a avaliação de marcadores séricos com diferentes funções ou características, utilizando amostras de sangue periférico, método não invasivo, com baixos riscos relacionados à sua coleta. Os marcadores séricos utilizados neste estudo estão relacionados à ativação endotelial (ICAM-1, VCAM-1, P-selectina, E-selectina, endotelina, VEGF-A), à inflamação (IL-6, IL-33, IL-18, IL6-Rα, TNF-α, CD163, pentraxina-3, CXCL4, TNF-RI), à coagulação (D-dímero, trombomodulina, FvW-A2) e à DECH aguda (HGF, Reg3A, ST2).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o impacto do TCPH alogênico aparentado HLA idêntico de irmão(ã) para tratamento da DF, na função endotelial, através da avaliação de marcadores séricos.

Os objetivos específicos foram:

a) avaliar os desfechos clínicos do TCPH alogênico aparentado HLA idêntico de irmão(ã) nos participantes do estudo, durante os primeiros 24 meses após o procedimento, e realizar a análise de sobrevida neste período;
b) avaliar os desfechos laboratoriais relacionados à DF (marcadores de hemólise e porcentagem de HbS), 24 meses pós-TCPH, nos pacientes com enxerto funcionante;
c) avaliar as diferenças dos níveis séricos, entre quatro momentos relacionados ao TCPH (pré-TCPH, 1 mês, 6 meses e 24 meses pós-TCPH), dos seguintes marcadores: IL-6, IL-33, IL-18, IL-6Rα, TNF-α, CD163, pentraxina-3, CXCL4 e TNF-RI, ICAM-1, VCAM-1, P-selectina, E-selectina, endotelina, VEGF-A, HGF, Reg3A, ST2, D-dímero, trombomodulina e FvW-A2;
d) realizar a análise comparativa dos níveis séricos dos 21 marcadores antes e 24 meses pós-TCPH em subgrupos de pacientes, de acordo com a idade, com a indicação para o TCPH, com a presença ou ausência de falha de enxertia, com a presença ou ausência de incompatibilidade ABO entre receptor e doador e em relação à presença ou ausência de DECH aguda.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Tipo do estudo

Trata-se de um estudo longitudinal prospectivo observacional, que avaliou marcadores plasmáticos relacionados à ativação e à disfunção endotelial em 21 pacientes submetidos ao TCPH alogênico aparentado HLA idêntico para tratamento da DF, na unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), entre janeiro de 2013 e janeiro de 2017, que preencheram os critérios de inclusão do estudo. As avaliações dos marcadores ocorreram nos períodos pré-TCPH, 1 mês, 6 meses e 24 meses pós-TCPH.

4.2 Critérios de inclusão e de exclusão

Os critérios de inclusão foram os seguintes: pacientes de qualquer idade com DF, incluindo HbSS, HbSC e HbSβ, confirmada laboratorialmente através do método de cromatografia líquida de alta performance, submetidos ao TCPH alogênico aparentado HLA idêntico entre janeiro de 2013 e janeiro de 2017; disponibilidade de amostras criopreservadas de plasma do paciente no período pré-TCPH (coletadas antes do início do regime de condicionamento e na ausência de complicações agudas da doença) e em pelo menos dois períodos pós-TCPH (1 mês, 6 meses e/ou 24 meses pós-infusão das CPHs).

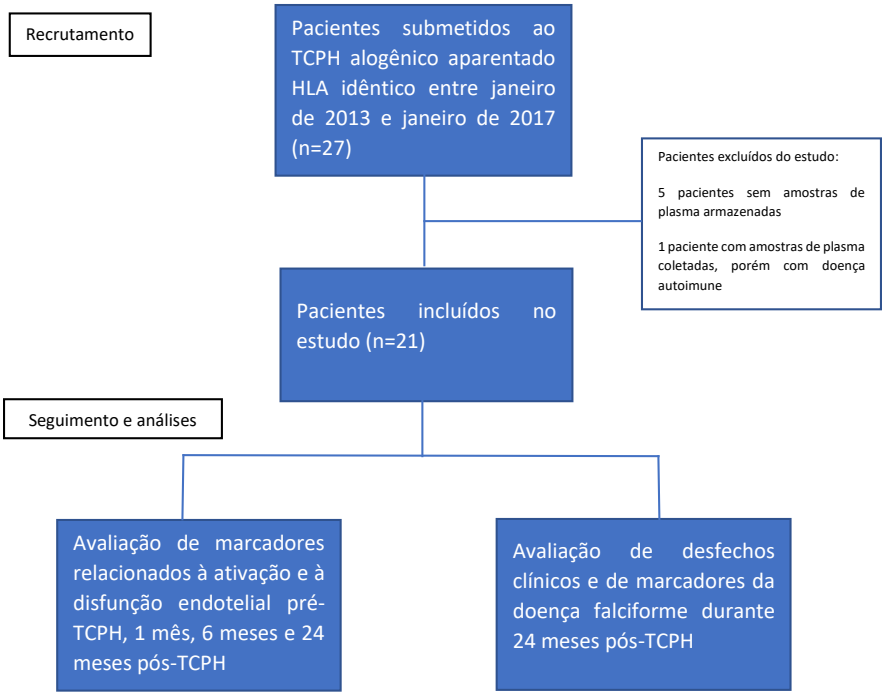
Os critérios de exclusão foram: pacientes submetidos a TCPH prévio; pacientes com doença neoplásica maligna ou doença autoimune antes do TCPH, ou desenvolvidas após o procedimento; óbito antes de 6 meses pós-TCPH.

4.3 Desenho do estudo

Vinte e sete pacientes foram submetidos ao TCPH para tratamento da DF no período avaliado e foram inicialmente considerados para este estudo. Vinte e dois deles atendiam aos critérios de inclusão, porém um destes foi excluído devido ao diagnóstico de doença autoimune (artrite reumatoide) associada à DF. Desta maneira, vinte e um pacientes foram

incluídos neste estudo (RPE001 a RPE021) (Figura 3). Os dados clínicos foram coletados de prontuários médicos. As amostras de plasma foram coletadas e criopreservadas nos períodos pré-TCPH, 1 mês, 6 meses e 24 meses pós-TCPH para a análise posterior de 21 marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial.

Figura 3 - Desenho do estudo



TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas.

4.4 Aprovação do estudo em comitê de ética em pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (número do parecer do CEP - 1.095.730: "Transplante de Medula Óssea em anemia falciforme: impacto do procedimento sobre marcadores da doença e qualidade de vida"), conforme previsto na resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo A). Os pacientes ou seus respectivos pais/responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e informado, e as crianças assinaram o termo de assentimento (Anexo B-D).

4.5 Características da população do estudo e do transplante de células progenitoras hematopoéticas

As características dos 21 participantes do estudo, assim como seus dados individualizados estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. A mediana (variação) de idade foi de 14 (7-33) anos, 71,4% eram do sexo masculino, 52,4% dos pacientes eram menores de 16 anos. Dezesseis (76,2%) pacientes tinham fenótipo HbSS, 14,3% HbSβ e 9,5% HbSC. Doze (57,1%) pacientes tiveram indicação neurológica para o TCPH, com AVE (clínico ou silencioso) e/ou alteração da velocidade do fluxo cerebral no doppler transcraniano (vasculopatia cerebral). Os demais pacientes (42,9%) apresentavam outras indicações, como CVO, incluindo STA, priapismo, úlcera de perna e aloimunização contra antígenos eritrocitários. Em relação ao tratamento da DF, 42,9% faziam uso de hidroxiureia, 23,8% estavam em regime de transfusão crônica associada à hidroxiureia, 28,6% recebiam apenas transfusão crônica. Apenas um paciente não estava em tratamento com HU nem em regime de transfusão crônica, recebendo apenas transfusão simples esporádica, pois apresentava úlceras extensas em ambos os membros inferiores, o que contraindicava o uso de HU, e tinha dificuldades de acesso à transfusão crônica no serviço de origem, devido à aloimunização contra antígenos eritrocitários.

A aloimunização contra antígenos eritrocitários foi definida como a formação de anticorpo de especificidade conhecida, identificado através da pesquisa de anticorpos irregulares. A CVO foi considerada como o episódio de dor aguda com duração de pelo menos 4 horas sem outra explicação além da vaso-oclusão e com necessidade de opioides endovenosos ou anti-inflamatórios. O tratamento com transfusão crônica foi definido como 10 ou mais transfusões em um período de um ano para prevenir complicações da DF (KELLY *et al.*, 2020).

Todos os pacientes foram submetidos ao TCPH alogênico aparentado HLA idêntico, sendo o doador irmão(ã), receberam condicionamento mieloablativo, composto por fludarabina (120-150 mg/m^2) e bussulfano (14-16 mg/kg) associados à ATG (4,5-10 mg/kg) e tiveram como fonte de CPH medula óssea. A profilaxia de DECH consistiu inicialmente em todos os casos de MTX 15 mg/m^2 um dia após a infusão, 10mg/m^2 nos dias 3, 6 e 11 pós-TCPH e CSA, com dose inicial de 3,0 mg/kg/dia, via endovenosa, sendo a dose equivalente transicionada para via oral assim que possível, após a enxertia. A programação de uso da

imunossupressão foi de 12 a 18 meses pós-TCPH. Devido à toxicidade causada pela CSA, 38% dos pacientes fizeram uso de outros imunossupressores, como sirolimus, tacrolimus e micofenolato de mofetila. A mediana (variação) de idade dos doadores foi de 17 (6-46) anos, 62% apresentavam traço falciforme (HbAS). Em relação à compatibilidade de tipo sanguíneo do sistema ABO entre receptor e doador, 47,6% eram isogrupos com seus doadores, 9,5% tinham incompatibilidade ABO maior, 28,6% incompatibilidade menor e 14,3% incompatibilidade bidirecional (Tabela 1 e 3).

A incompatibilidade ABO foi considerada como a diferença de tipo sanguíneo entre o receptor e o respectivo doador e foi classificada em 3 tipos. A incompatibilidade maior foi definida como a presença de anticorpos no receptor contra antígenos do sistema ABO presentes no doador (exemplo: doador tipo A e receptor tipo O); menor, quando o doador apresentava anticorpos contra os antígenos do sistema ABO do receptor (exemplo: doador tipo O e receptor tipo A) e bidirecional, quando ambos apresentavam anticorpos entre eles (exemplo: doador A e receptor B) (SEEBACH *et al.*, 2005). Os pacientes com incompatibilidade ABO maior, menor e bidirecional receberam medula óssea processada para remover hemácias, plasma e ambos, respectivamente. Transfusões de concentrados de hemácias para manter a Hb entre 9,0 e 10,0 g/dL foram realizadas. A transfusão de troca ou eritrocitaférese foi realizada nos pacientes antes da realização do TCPH para obter HbS ≤ 30% e a remoção de iso-hemaglutinina anti-A/B, através de plasmaférese, foi realizada quando o paciente apresentava incompatibilidade ABO maior/bidirecional e titulação de anticorpo ≥ 32 (até atingir título < 32).

Tabela 1 - Características da população do estudo e do TCPH.

Variáveis	**Grupo Estudo (n=21)**
Idade, anos (mediana, variação)	14 (7-33)
Sexo, n (%)	
Masculino	15 (71,4)
Feminino	6 (28,6)
Idade	
<16 anos	11 (52,4)
≥16 anos	10 (47,6)
Fenótipo, n (%)	
HbSS	16 (76,2)
HbSβ	3 (14,3)
HbSC	2 (9,5)
Tratamento prévio ao TCPH, n (%)	
Hidroxiureia	8 (38,1)
Transfusão crônica + hidroxiureia	6 (28,5)
Transfusão crônica	6 (28,6)
Transfusão esporádica	1 (4,8)
Indicação para o TCPH, n (%)	
Neurológica	12 (57,1)
Outras (incluindo CVO)	9 (42,9)
Pesquisa de anticorpos irregulares pré-TCPH, n (%)	
Positiva	4 (19)
Negativa	17 (81)
Doador com traço falciforme, n (%)	
Sim	13 (62)
Não	8 (38)
Idade do doador (mediana, variação)	17 (6-46)
Compatibilidade ABO, n (%)	
Isogrupo	9 (42,9)
Incompatibilidade	12 (57,1)
Maior	5 (23,8)
Menor	4 (19)
Bidirecional	3 (14,3)

TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; CVO, crise vaso-oclusiva

Tabela 2 - Características clínicas da população do estudo.

ID	Gênero	Idade no TCPH	Fenótipo	Tratamento prévio ao TCPH	Indicação para o TCPH	PAI pré-TCPH
RPE001	M	24	HbSS	Transfusão crônica e Hidroxiureia	AVE	Negativa
RPE002	M	13	HbSβ	Transfusão crônica	Vasculopatia cerebral	Negativa
RPE003	M	25	HbSβ	Hidroxiureia	CVO; Priapismo	Negativa
RPE004	M	18	HbSS	Transfusão crônica e Hidroxiureia	AVE; Priapismo	Negativa
RPE005	M	9	HbSC	Transfusão crônica e Hidroxiureia	Vasculopatia cerebral	Negativa
RPE006	F	13	HbSS	Hidroxiureia	CVO	Negativa
RPE007	M	14	HbSS	Transfusão crônica e Hidroxiureia	AVE	Negativa
RPE008	F	19	HbSS	Hidroxiureia	CVO	Negativa
RPE009	F	10	HbSS	Transfusão crônica	Vasculopatia cerebral	Negativa
RPE010	M	11	HbSS	Transfusão crônica e Hidroxiureia	AVE; CVO; Aloimunização	Anti-Fya + auto Ac
RPE011	M	10	HbSS	Transfusão crônica	AVE	Negativa
RPE012	M	26	HbSC	Hidroxiureia	CVO	Negativa
RPE013	M	16	HbSβ	Hidroxiureia	CVO; Vasculopatia cerebral	Negativa
RPE014	M	30	HbSS	Transfusão simples esporádica	CVO; Priapismo; Aloimunização; Úlceras de membros inferiores	Anti-C
RPE015	M	12	HbSS	Transfusão crônica	Vasculopatia cerebral	Negativa
RPE016	M	20	HbSS	Hidroxiureia	CVO	Negativa
RPE017	M	7	HbSS	Transfusão crônica	AVE	Negativa
RPE018	F	33	HbSS	Transfusão crônica e Hidroxiureia	CVO; Aloimunização	Anti-Cw + auto Ac
RPE019	F	14	HbSS	Transfusão crônica	AVE; CVO	Negativa
RPE020	M	12	HbSS	Hidroxiureia	CVO	Negativa
RPE021	F	32	HbSS	Hidroxiureia	CVO; Aloimunização	Anti-E + auto Ac

ID, identificação; M, masculino; F, feminino; TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; AVE, acidente vascular encefálico; CVO, crise vaso-oclusiva; PAI, painel de anticorpos irregulares; Ac, anticorpo

Tabela 3 - Características do TCPH alogênico aparentado HLA idêntico com condicionamento mieloablativo e fonte de CPH medula óssea da população do estudo.

ID	CNT ($x10^8$/kg)	Gênero do receptor	Gênero do doador	Doador com traço falciforme	Idade do doador, anos	Compatibilidade ABO
RPE001	4,02	M	F	Não	20	Incompatibilidade Bidirecional
RPE002	3,88	M	M	Não	18	Incompatibilidade Maior
RPE003	1,92	M	F	Não	28	Isogrupo
RPE004	3,83	M	M	Sim	21	Incompatibilidade Menor
RPE005	4,98	M	F	Sim	18	Isogrupo
RPE006	3,67	F	F	Sim	10	Isogrupo
RPE007	4,64	M	F	Não	14	Isogrupo
RPE008	3,35	F	M	Sim	18	Isogrupo
RPE009	5,20	F	F	Sim	13	Isogrupo
RPE010	3,58	M	F	Sim	11	Isogrupo
RPE011	3,29	M	F	Não	17	Incompatibilidade Maior
RPE012	2,24	M	F	Sim	23	Incompatibilidade Maior
RPE013	2,71	M	M	Não	15	Incompatibilidade Maior
RPE014	3,69	M	M	Sim	33	Incompatibilidade Menor
RPE015	1,63	M	M	Sim	6	Isogrupo
RPE016	2,99	M	M	Sim	9	Isogrupo
RPE017	3,03	M	F	Sim	12	Incompatibilidade Maior
RPE018	2,00	F	F	Sim	46	Incompatibilidade Bidirecional
RPE019	2,27	F	M	Não	7	Incompatibilidade Menor
RPE020	2,72	M	M	Sim	15	Incompatibilidade Bidirecional
RPE021	3,07	F	F	Não	43	Incompatibilidade Menor

TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; CPH, célula progenitora hematopoética; ID, identificação; CNT, células nucleadas totais; F, feminino; M, masculino

4.6 Acompanhamento durante e após o transplante de células progenitoras hematopoéticas

Os pacientes foram acompanhados pelas equipes médica e multiprofissional do Hospital das Clínicas da FMRP-USP durante e após o TCPH, conforme protocolo institucional, sendo o seguimento dividido entre internação, acompanhamento em Hospital-Dia e acompanhamento ambulatorial (Apêndice A). O sucesso do tratamento foi avaliado através de marcadores relacionados à DF, incluindo marcadores de hemólise e porcentagem de HbS; através da identificação de complicações relacionadas à doença e da identificação de sinais de falha de enxertia, primária ou secundária. Também foram avaliados sinais e sintomas de complicações relacionadas ao TCPH, incluindo a DECH aguda e crônica. Essas avaliações foram feitas

semanalmente até 100 dias, mensalmente até 6 meses e depois anualmente, após o TCPH. O intervalo entre as avaliações foi menor em alguns casos, conforme decisão da equipe médica.

A data da enxertia da medula óssea foi considerada como o primeiro dia de contagem de neutrófilos acima de 0,5 x 10^6 células/µL, que se manteve por 3 dias consecutivos. A falha de enxertia primária foi considerada a ausência do critério de enxertia após um prazo de 28 dias da infusão das CPHs. A falha de enxertia secundária foi considerada como perda do enxerto após a presença dos critérios de enxertia da medula óssea (GLUCKMAN *et al.,* 2020), sendo definida como a perda do quimerismo do doador e/ou a recidiva da DF.

A recidiva da DF foi definida como o aumento da HbS acima de 50%, associada a alterações de marcadores de hemólise, enquanto a perda do quimerismo do doador foi avaliada através da técnica de repetição em tandem de numeração variável (VNTR) qualitativa. A infusão de linfócitos do doador (BARON; BEGUIN, 2000) foi considerada nos casos de falha de enxertia secundária, enquanto o paciente ainda apresentava quimerismo do doador, na tentativa de reverter o processo.

A DECH aguda foi considerada uma resposta inflamatória alogênica acometendo exclusivamente 3 órgãos/sistemas (pele, fígado e trato gastrointestinal). O diagnóstico de DECH aguda foi feito através de alterações clínicas e laboratoriais características da doença (eritema maculopapular em pele, hiperbilirrubinemia devido à colestase e manifestações gastrointestinais, como anorexia, perda de peso, náusea, vômito, diarreia, dor abdominal, sangramento gastrointestinal), após exclusão de outros diagnósticos diferenciais, como farmacodermia e infecção, sendo necessária a biópsia do órgão acometido em alguns casos. A DECH crônica correspondeu às manifestações relacionadas à alo e à autoimunidade em qualquer órgão/sistema, na presença de sinais diagnósticos (como lesões tipo líquen-plano na pele e na boca) ou distintivos (como eritema na pele) acompanhados de confirmação adicional em pelo menos um órgão-alvo, após exclusão de outros diagnósticos diferenciais (SCHOEMANS *et al.*, 2018).

A classificação da DECH aguda pela equipe médica no momento da ocorrência do evento foi feita de acordo com critérios de Glucksberg modificados e/ou do Consórcio Internacional de DECH aguda de Monte Sinai (MAGIC, do inglês, *Mount Sinai Acute Graft Versus Host Disease International Consortium*) e a de DECH crônica de acordo com os critérios do NIH, de 2005 ou da sua revisão de 2014, envolvendo oito órgãos/sistemas (pele, boca, olho, fígado, trato gastrointestinal, articulação/fáscia, trato genital e pulmão). Durante a análise dos resultados deste estudo foi feita a reclassificação de todos os pacientes, retrospectivamente,

através da descrição de sinais e sintomas descritos em prontuário médico, utilizando os critérios de MAGIC para DECH aguda e do NIH de 2014 para DECH crônica, para facilitar as análises. A DECH aguda foi classificada em graus 1 a 4, de acordo com os critérios de MAGIC e foi considerada DECH aguda clássica quando o diagnóstico foi realizado antes de 100 dias após o TCPH, e tardia quando ocorreu após 100 dias. A DECH crônica foi classificada em leve, moderada e grave de acordo com os critérios do NIH de 2014 (SCHOEMANS *et al.*, 2018) (Anexo E).

Os pacientes que desenvolveram DECH aguda com escore maior ou igual a 2 (MAGIC) e DECH crônica moderada ou grave (NIH 2014) receberam tratamento sistêmico de primeira linha com corticoterapia, conforme protocolo institucional. Os pacientes que tiveram DECH com acometimento apenas de pele, com score 1 na DECH aguda e classificação leve na DECH crônica, foram tratados com corticoide tópico (FLOWERS; MARTIN, 2015; MAJOR-MONFRIED *et al.*, 2018; MARTIN *et al.*, 2012; SCHOEMANS *et al.*, 2018).

A pesquisa de reativação de citomegalovírus (CMV), vírus capaz de causar infecções graves e falha de enxertia no contexto do TCPH, por técnica de antigenemia ou reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada semanalmente nos primeiros 100 dias pós-TCPH (LJUNGMAN *et al.*, 2010). Os pacientes que apresentaram a reativação de CMV foram avaliados quanto à necessidade de tratamento preemptivo, com o objetivo de prevenir o desenvolvimento de doença causada pelo vírus. O tratamento preemptivo foi realizado com ganciclovir endovenoso, de acordo com o protocolo institucional.

Os pacientes elegíveis para este estudo foram divididos retrospectivamente, ao final dos 24 meses pós-TCPH, em subgrupos de acordo com a idade no momento do TCPH (<16 anos e ≥16 anos); a indicação para o transplante (alteração neurológica e outras indicações, como CVO, incluindo STA, aloimunização contra antígenos eritrocitários, úlcera de perna, priapismo) e a presença ou a ausência de falha de enxertia secundária, em qualquer momento entre a data da enxertia da medula óssea e 24 meses pós-TCPH.

Os pacientes que não apresentaram falha de enxertia secundária, considerados com enxerto funcionante, também foram divididos retrospectivamente, ao final dos 24 meses pós-TCPH, em subgrupos, de acordo com a idade no momento do TCPH e a indicação ao transplante, conforme descrito acima. Adicionalmente, foram subdivididos de acordo com a presença ou a ausência de DECH aguda, em qualquer momento entre a enxertia da medula

óssea e 24 meses pós-TCPH, e de acordo com a presença ou não de incompatibilidade na tipagem sanguínea do grupo ABO entre paciente (receptor) e doador.

4.7 Avaliação de marcadores relacionados à doença falciforme e de quimerismo

Para a avaliação da DF, a quantificação da porcentagem de HbS foi realizada por meio da técnica de cromatografia líquida de alta performance no laboratório de anemias hereditárias da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto. A quantificação dos marcadores de hemólise, através da contagem de reticulócitos, dosagem de Hb, dosagem de desidrogenase lática (DHL) e de bilirrubina indireta, foi feita nos laboratórios de hematologia e de bioquímica do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. A dosagem de Hb foi feita através de um contador automático de células, a contagem absoluta de reticulócitos foi realizada através da técnica de absorbância e dispersão de luz; a dosagem de DHL foi realizada através do método enzimático e a dosagem de bilirrubina indireta foi realizada utilizando o diclorofenildiazônio.

A avaliação do quimerismo foi realizada através do exame de VNTR qualitativo em células nucleadas totais de sangue periférico ou de medula óssea. Nesta técnica, após a extração do DNA, 9 *loci* (D1S80, D4S43, Apo-B, F13-A, VW, PAH, D12567, TH, TPOX) foram avaliados, sendo feita a visualização das bandas em gel corado com acrilamida. Nas amostras pré-TCPH foram identificados *loci* informativos, que tinham pelo menos um alelo com diferente número de repetições entre receptor e doador. Após o TCPH os pacientes foram testados em diferentes momentos usando apenas os *loci* informativos. Essa análise permitiu uma determinação qualitativa do quimerismo. Quimera completa do doador foi definida quando apenas *loci* informativos do doador foram encontrados, quimerismo misto, quando pelo menos um alelo específico do receptor foi detectado além dos alelos do doador, e perda do quimerismo, quando apenas *loci* informativos do receptor foram identificados (ANTIN *et al.*, 2001; MOSSALLAM *et al.*, 2009).

4.8 Quantificação de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial

Os níveis séricos de 21 marcadores relacionados direta ou indiretamente à ativação e à disfunção endotelial foram dosados nos períodos pré-TCPH, 1 mês, 6 meses e 24 meses pós-TCPH em todos os pacientes do grupo estudo. Estes marcadores foram separados em 4

grupos, de acordo com suas características: marcadores relacionados à ativação endotelial (endotelina-1, E-selectina, VCAM-1, ICAM-1, P-selectina, VEGF-A), à inflamação (TNF-α, TNF-RI, IL-6, IL-33, IL-18, IL-6Rα, pentraxina-3, CXCL4, CD163), à coagulação (FvW-A2, D-dímero, trombomodulina) e à doença do enxerto contra o hospedeiro aguda (Reg3A, ST2, HGF).

Todas as coletas coincidiram com a data de realização dos exames de rotina realizados no serviço de transplante, de acordo com protocolo da instituição. Foram coletados 10 ml de sangue venoso periférico em tubo com EDTA e, imediatamente após a coleta, o material foi processado, sendo feita a extração de plasma por meio da centrifugação a 810g (15 minutos, 4ºC). O plasma removido foi novamente centrifugado por mais 15 minutos, a 810g (4ºC). Este plasma foi então congelado a -80ºC até a realização da análise.

A quantificação dos marcadores séricos foi feita utilizando a técnica de multiplex (Magnetic Luminex Assay, R&D System Inc., Minnesota, EUA). As proteínas de cada curva padrão (9 curvas-padrão: B, C, D, H, I, J, O, Q, R) foram inicialmente reconstituídas em 250µL de calibrator diluent RD6-52 e foram incubadas por 15 minutos sob agitação leve. Após a incubação, foram adicionados 100µL de cada curva-padrão e 100µL de calibrator diluent RD6-52, gerando um volume final de 1000µL, estabelecendo-se dessa maneira o ponto inicial da curva, a partir do qual foi realizada a diluição seriada (1:3). As micropartículas de captura foram diluídas em diluent RD2-1 (500µL de micropartícula e 5000µL de diluente), os anticorpos biotinilados também foram diluídos em diluent RD2-1 (500µL de anticorpos e 5000µL de diluente) e a estreptavidin-PE em wash buffer (220µL de estreptavidin e 5035µL de tampão). Foram feitas duas diluições das amostras em calibrator diluent RD6- 52 (30µL de amostra e 30µL de tampão). Posteriormente foram pipetados 50µL das micropartículas, 50µL da curva padrão ou 50µL de cada amostra em uma placa de 96 poços e a placa foi incubada por 2 horas à 850 rpm, em temperatura ambiente e protegida da luz. Após a incubação, a placa foi colocada em um magneto (permitindo que as micropartículas magnéticas ficassem presas) para a realização de 3 lavagens com 100µL de wash buffer. Após a retirada da placa do magneto, 50µL de anticorpos biotinilados foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada novamente por 1 hora à 850 rpm, em temperatura ambiente e protegida da luz. Foram feitas 3 lavagens da placa com 100µL de wash buffer, após as lavagens 50µL de estreptavidin-PE foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada por 30 minutos à 850 rpm, em temperatura ambiente e protegida da luz. Finalmente, a placa foi lavada 3 vezes com

100µL de wash buffer, 100µL 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.

4.9 Análise Estatística

A análise estatística e as correlações entre os níveis séricos dos marcadores e os desfechos clínicos relacionados ao TCPH foram realizadas. A análise exploratória dos dados incluiu média, mediana, desvio-padrão e variação para variáveis contínuas; e número e proporção para variáveis categóricas. A distribuição das variáveis contínuas foi analisada pelas estatísticas descritivas, assimetria, curtose, gráfico histograma e teste específico para o pressuposto teórico de normalidade Shapiro-Wilk (CONOVER, 1998). As curvas de sobrevida foram construídas pelo método Kaplan-Meier e a comparação entre os grupos foi feita pelo teste log-rank de Mantel (CAMPBELL, 2007).

Para a curva de sobrevida global, o tempo foi calculado entre a data do TCPH (data da infusão das CPHs) e a data do óbito ou último contato com o paciente vivo; para a curva de sobrevida livre de doença (probabilidade de estar vivo sem recidiva da doença), o tempo foi calculado entre a data do TCPH e a data da recidiva ou último contato com paciente vivo e sem recidiva; para a curva de sobrevida livre de doença e de DECH (probabilidade de estar vivo, sem recidiva da doença, sem DECH aguda grau 3-4 e sem DECH crônica com necessidade de tratamento sistêmico), o tempo foi calculado entre a data do TCPH e a data em que se desenvolveu o primeiro dos eventos ou o último contato com paciente sem nenhum destes eventos.

A comparação de variáveis numéricas entre dois grupos independentes foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição dos valores e a comparação de variáveis categóricas entre dois grupos independentes foi realizada pelo teste exato de Fisher. A análise comparativa dos marcadores relacionados à ativação e à disfunção endotelial ao longo do tempo (pré-TCPH, 1 mês, 6 meses e 24 meses pós-TCPH) foi realizada pelo teste de Friedman. Para as variáveis que apresentaram diferença significativa, o teste dos Postos Assinalados de Wilcoxon foi aplicado na comparação aos pares (CONOVER, 1998; SIEGEL; CASTELLAN JR, 2006). A análise estatística foi realizada com o software IBM-SPSS Statistics versão 24 (IBM Corporation, NY, USA) e valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Desfechos clínicos

Todos os pacientes do estudo tiveram a enxertia da medula óssea confirmada dentro das primeiras 4 semanas pós-TCPH, com mediana de 21 dias, variando de 16 a 28 dias pós-infusão das CPHs. Dez (47,6%) pacientes desenvolveram DECH aguda, com classificação MAGIC grau 1-3 nos primeiros 24 meses pós-TCPH, não sendo identificado nenhum caso de DECH aguda grau 4 (Tabelas 4 e 5). A duração do tratamento da DECH aguda foi de 3 meses no paciente RPE003, 2 meses nos pacientes RPE005, RPE007, RPE020 e RPE021 e 1 mês nos pacientes RPE004, RPE006, RPE014, RPE015 e RPE018. A pele foi o órgão mais acometido (9 pacientes), além de fígado e trato gastrointestinal. Todos os pacientes com DECH aguda grau 2-3 receberam tratamento sistêmico com corticoterapia e tiveram resposta completa, sem necessidade de terapia de segunda linha. O paciente que desenvolveu DECH aguda grau 1 (RPE005) teve apenas acometimento de pele e fez uso de corticóide tópico com resposta completa (Tabela 4). A DECH aguda ocorreu em apenas um (RPE006) dos três pacientes que receberam infusão de linfócito do doador. Aos 24 meses pós-TCPH, apenas o paciente RPE020 estava em tratamento com corticoterapia sistêmica para DECH aguda, porém já com resposta completa, sem atividade da doença; os demais já haviam finalizado o tratamento. Todos os pacientes tiveram resposta completa ao tratamento de primeira linha com corticoterapia sistêmica ou tópica.

Três (14,9%) pacientes tiveram diagnóstico de DECH crônica (RPE003, RPE005, RPE017) e a duração do seu tratamento foi de 1, 5 e 8 meses, respectivamente. O órgão acometido em todos os casos foi a pele. Os pacientes com DECH crônica moderada fizeram uso de tratamento sistêmico com corticoterapia e o paciente com DECH crônica leve recebeu tratamento com corticoide tópico. Apenas o paciente RPE017 apresentava atividade da doença e estava em uso de corticoide tópico no momento da avaliação de 24 meses pós-TCPH. O paciente RPE003 teve o diagnóstico de DECH crônica confirmada por biópsia de pele, que apresentava alterações liquenoides e apresentou resolução completa das lesões após 1 mês do início da corticoterapia sistêmica; já no D+301 ele apresentou DECH aguda tardia, também confirmada por biópsia, caracterizada por dermatite de interface vacuolar, com resolução completa após uso de corticoterapia sistêmica. O paciente RPE005 teve DECH aguda resolvida

antes do diagnóstico de DECH crônica e o paciente RPE017 não teve diagnóstico de DECH aguda (Tabela 4). Todos os pacientes que necessitaram de tratamento sistêmico tiveram resposta completa durante o período do estudo, sem necessidade de tratamento de segunda linha.

Dezesseis (76,2%) pacientes apresentaram reativação de CMV nos primeiros 100 dias pós-TCPH. Destes, 12 receberam tratamento preemptivo com ganciclovir e nenhum teve doença causada pelo vírus. A mediana do tempo de imunossupressão pós-TCPH foi de 15 meses, variando de 5 a 23 meses (Tabelas 4 e 5). Dois pacientes suspenderam sem orientação médica a imunossupressão (RPE012 e RPE018) aos 08 e 15 meses pós-TCPH, respectivamente, não apresentando nenhuma complicação relacionada à suspensão precoce.

Cinco (23,8%) pacientes tiveram falha de enxertia secundária com recuperação autóloga, exceto o paciente RPE021, que permaneceu com citopenias refratárias. Todos os pacientes que perderam o enxerto voltaram a apresentar CVO, alteração dos níveis séricos dos marcadores de hemólise e aumento de HbS durante o período do estudo, exceto o paciente RPE006, que apesar de apresentar sinais laboratoriais da doença, não apresentou sintomas; três deles receberam infusão de linfócitos do doador como tentativa de reverter a falha de enxertia, sem sucesso (Tabelas 4 e 5); e dois foram submetidos a um segundo TCPH, com condicionamento de intensidade reduzida e profilaxia de DECH com ciclosporina e metotrexato. O paciente RPE021 evoluiu a óbito sete meses e 27 dias após o primeiro e o segundo TCPH, respectivamente, antes da enxertia neutrofílica no segundo transplante, devido à complicação infecciosa (choque séptico) (Tabela 6). Os pacientes que tiveram falha de enxertia secundária estavam em uso de imunossupressão no momento do diagnóstico e esta foi suspensa após a confirmação da falha. Nenhum paciente do grupo estudo apresentou complicações neurológicas decorrentes da doença falciforme, no período deste estudo.

Dois (9,5%) pacientes (RPE013 e RPE017) apresentaram citopenias com quimerismo estável do doador, caracterizando uma função pobre do enxerto e tiveram a imunossupressão retirada com 7 e 15 meses pós-TCPH, respectivamente, apresentando resolução completa das citopenias após a retirada. No momento da avaliação de 24 meses pós-TCPH, dois pacientes ainda estavam em uso de imunossupressão (RPE005, RPE015), sendo que o atraso da retirada foi devido ao tratamento de DECH crônica de pele e à suspeita de DECH de pele, respectivamente.

Dezesseis pacientes mantiveram o enxerto funcionante durante os primeiros 24 meses pós-TCPH, sem evidência da doença de base. Destes, 3 (17,7%) apresentaram quimerismo completo do doador, avaliado por técnica de VNTR qualitativo, aos 24 meses pós-TCPH e os demais (87,5%), quimerismo misto (Tabela 4). Todos os pacientes cujos doadores tinham o traço falciforme permaneceram também com o traço falciforme após o TCPH.

Tabela 4 - Desfechos clínicos individuais nos primeiros 24 meses pós-TCPH.

ID	Reativação de CMV até o D+100	Tratamento preemptivo para CMV até o D+100	DECH aguda, dias pós-TCPH	Órgãos acometidos pela DECHa	Classificação da DECHa (MAGIC)	DECH crônica, dias pós-TCPH	Órgão acometido pela DECHc	Classificação da DECHc (NIH 2014)	Falha de enxertia secundária	Quimera, 24 meses pós-TCPH	Tempo de IS, meses pós-TCPH
RPE001	Sim	Sim	Não	NA	NA	Não	NA	NA	Não	Doador	18
RPE002	Sim	Sim	Não	NA	NA	Não	NA	NA	Sim	Paciente	14
RPE003	Sim	Sim	Sim (301)	Pele e TGI	Grau 2	Sim (35)	Pele	Moderado	Sim	Paciente	15
RPE004	Sim	Sim	Sim (53)	Pele	Grau 3	Não	NA	NA	Não	Doador	16
RPE005	Sim	Sim	Sim (22)	Pele	Grau 1	Sim (335)	Pele	Moderado	Não	Mista	25
RPE006	Sim	Sim	Sim (56)	Pele	Grau 2	Não	NA	NA	Sim	Paciente	20
RPE007	Sim	Não	Sim (273)	Pele	Grau 2	Não	NA	NA	Não	Mista	20
RPE008	Não	Não	Não	NA	NA	Não	NA	NA	Não	Mista	20
RPE009	Sim	Sim	Não	NA	NA	Não	NA	NA	Não	Mista	22
RPE010	Não	Não	Não	NA	NA	Não	NA	Leve	Não	Mista	22
RPE011	Sim	Sim	Não	NA	NA	Não	NA	NA	Sim	Paciente	23
RPE012	Sim	Sim	Não	NA	NA	Não	NA	NA	Não	Mista	8
RPE013	Não	Não	Não	NA	NA	Não	NA	NA	Não	Mista	7
RPE014	Sim	Não	Sim (34)	Pele	Grau 2	Não	NA	NA	Não	Mista	21
RPE015	Sim	Não	Sim (76)	Pele	Grau 1	Não	NA	NA	Não	Mista	26
REP016	Sim	Não	Não	NA	NA	Não	NA	NA	Não	Mista	18
RPE017	Sim	Sim	Não	NA	NA	Sim (492)	Pele	Leve	Não	Mista	15
RPE018	Sim	Sim	Sim (78)	TGI	Grau 2	Não	NA	NA	Não	Doador	15
RPE019	Não	Não	Não	NA	NA	Não	NA	NA	Não	Mista	18
RPE020	Não	Não	Sim (476)	Pele	Grau 2	Não	NA	NA	Não	Mista	21
RPE021	Sim	Sim	Sim (28)	Pele e Fígado	Grau 2	Não	NA	NA	Sim*	Paciente	5

TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; ID, identificação; CMV, citomegalovírus; DECH, doença do enxerto contra o hospedeiro; DECHa, DECH aguda; TGI, trato gastrointestinal; MAGIC, Mount Sinai Acute GVHD International Consortium; DECHc, DECH crônica; NIH (National Institute of Health); NA, não se aplica; IS, imunossupressão

*Óbito 7 meses pós-TCPH

Tabela 5 - Desfechos clínicos nos primeiros 24 meses pós-TCPH.

Variáveis	Grupo estudo (n=21)	Enxerto funcionante (n=16)
DECH aguda, n (%)	10 (47,6)	7 (43,8)
Grau 1	2 (9,5)	2 (12,5)
Grau 2	7 (33,3)	4 (25,0)
Grau 3	1 (4,8)	1 (6,2)
Grau 4	0	0
DECH crônica, n (%)	3 (14,3)	2 (12,5)
Leve	1 (4,8)	1 (6,2)
Moderada	2 (9,5)	1 (6,2)
Grave	0	0
Óbito, n (%)	1 (4,8)	0
Reativação de CMV	16 (76,2)	11 (68,7)
Com tratamento preemptivo	12 (57,1)	7 (43,7)
Sem tratamento preemptivo	4 (19,0)	4 (25,0)
Tempo de imunossupressão, meses (mediana, variação)	18 (5-26)	19 (7-26)

TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; DECH, doença do enxerto contra o hospedeiro; CMV, citomegalovírus

Tabela 6 - Desfechos relacionados à falha de enxertia secundária

ID	Falha de enxertia, meses pós-TCPH	Uso de ILD	Segundo TCPH	Condicionamento do segundo TCPH	Enxertia	Recuperação autóloga	Óbito, (meses pós-TCPH)
RPE002	12	Sim	Não	NA	NA	NA	Não
RPE003	15	Não	Sim	FLU +Cy pós (D+3 e D+4)	Não	Sim	Não
RPE006	20	Sim	Não	NA	NA	NA	Não
RPE011	23	Sim	Não	NA	NA	NA	Não
RPE021	5	Não	Sim	FLU + CY + ATG	Não	Não	Sim (7)

ID, identificação; TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; DLI, donor lymphocyte infusion (infusão de linfócitos do doador); NA, não se aplica; FLU, fludarabina; CY, ciclofosfamida; ATG, timoglobulina

5.2 Avaliação de marcadores de hemólise e de hemoglobina S nos pacientes com enxerto funcionante

No grupo de pacientes que tiveram sucesso no TCPH para tratamento da DF, com enxerto funcionante durante os primeiros 24 meses pós-TCPH, a análise dos marcadores de hemólise e da porcentagem de HbS, realizada dentro da rotina do serviço de TMO do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, mostrou aumento do nível sérico de Hb, redução dos níveis de bilirrubina indireta, de DHL e de HbS, aos 24 meses pós-TCPH (p<0,001; p<0,001; p=0,001 e p=0,047, respectivamente). A contagem de reticulócitos não apresentou alteração significativa entre as duas avaliações (Tabela 7). Três pacientes não tiveram a contagem de reticulócitos e dois não tiveram a dosagem de DHL realizadas no mesmo momento em que a amostra pré-TCPH para avaliação de marcadores de ativação e disfunção endotelial (Apêndice B).

Tabela 7 - Análise dos marcadores séricos relacionados à doença falciforme pré-TCPH e 24 meses pós-TCPH, nos pacientes com enxerto funcionante.

Marcador	N	Pré-TCPH mediana (IIQ)	24 meses pós-TCPH mediana (IIQ)	Valor P
Hemoglobina (g/dL)	16	9,55 (8,65-10,40)	13,95 (12,47-15,95)	**< 0,001**
Reticulócitos (10^6/ml)	13	0,07 (0,02-0,17)	0,07 (0,06-0,12)	0,861
Bilirrubina indireta (mg/dL)	16	1,82 (1,36-3,02)	0,036 (0,24-0,68)	**< 0,001**
DHL (UI/L)	14	741,0 (590,7-839,5)	357,5 (304,5-401,2)	**0,001**
HbS (%)	16	38,2 (31,2-48,6)	37,9 (8,97-39,1)	**0,047**

TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; IIQ, intervalo interquartil; DHL, desidrogenase láctica; HbS, hemoglobina S.

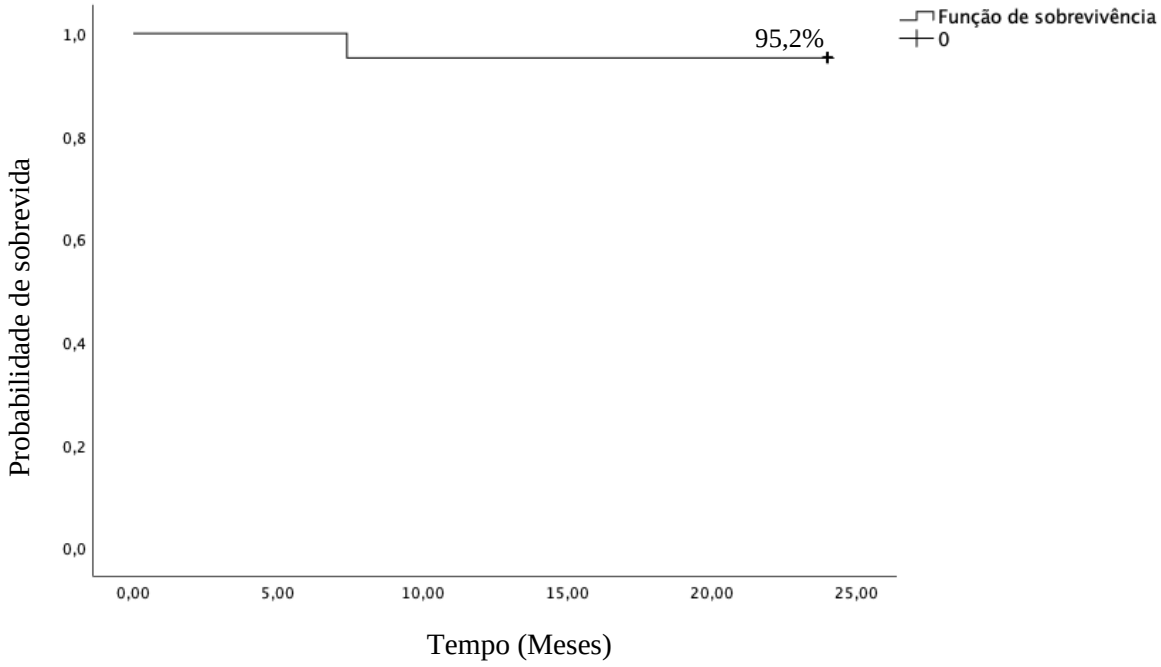
5.3 Análise de sobrevida

A sobrevida global em 24 meses na população do estudo (n=21) foi de 95,2%, com sobrevida média de 23,2 meses (Intervalo de confiança (IC) 95% = 21,7 – 24,7 meses), 100% para os pacientes menores de 16 anos (n=11) e 90% para pacientes maiores ou iguais a 16 anos (n=10) (p=0,294) (Figura 4). A sobrevida livre de doença em 24 meses pós-TCPH foi de 76,2%, com sobrevida média de 21,5 meses (IC 95% = 19,2 – 23,8 meses) no grupo estudo (n=21), 72,7%, com sobrevida média de 21,8 meses (IC 95% = 19,1 – 24.5 meses) em menores

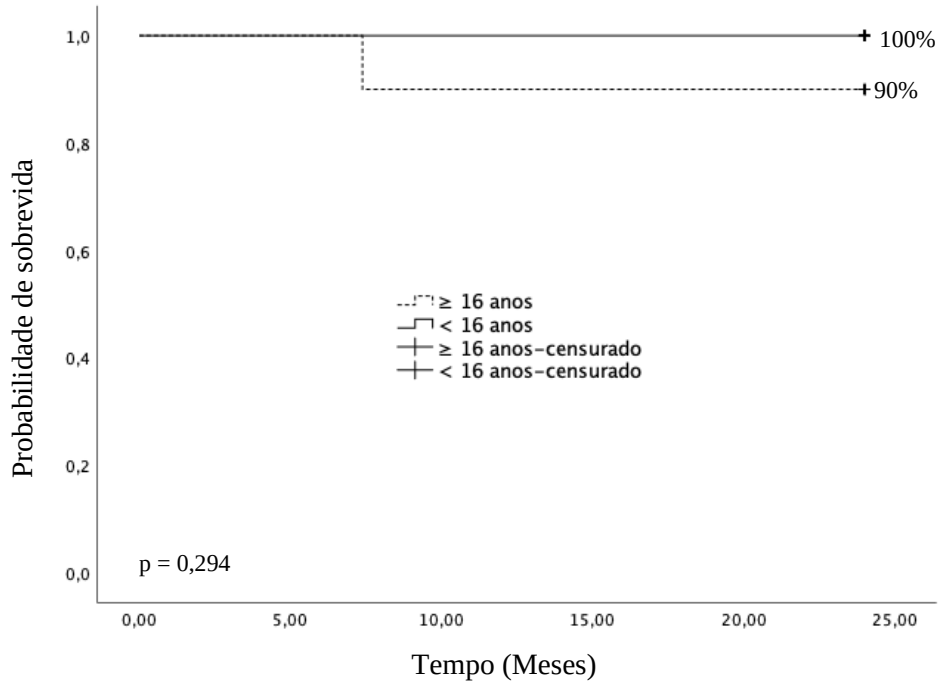
de 16 anos (n=11) e 80%, com sobrevida média de 21,2 meses (IC 95% = 17,5 – 24.9 meses) em pacientes com 16 anos ou mais (n=10) (p=0,740) (Figura 5). A sobrevida livre de doença, livre de DECH aguda grau 3-4 e de DECH crônica com necessidade de tratamento imunossupressor (GRFS) foi de 57,1%, com sobrevida média de 17,7 meses (IC 95% = 14,0 – 21,4 meses) em 24 meses para a população do estudo (n=21); 45,5% para os pacientes menores de 16 anos (n=11), com sobrevida média de 17,9 meses (IC 95% = 13,5 – 22,2 meses) e 70% para os pacientes maiores ou iguais a 16 anos (n=10), com sobrevida média de 17,6 meses (IC 95% = 11,5 – 23,7 meses) (p=0,442) (Figura 6).

Figura 4 - Sobrevida global em 24 meses pós-TCPH para tratamento da DF

a)



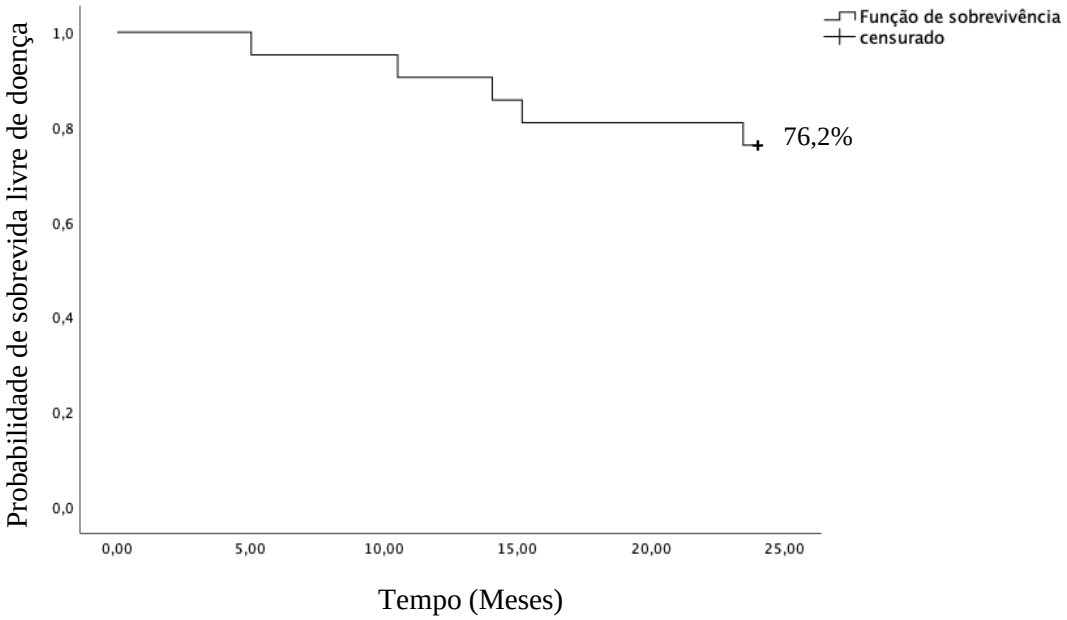
b)



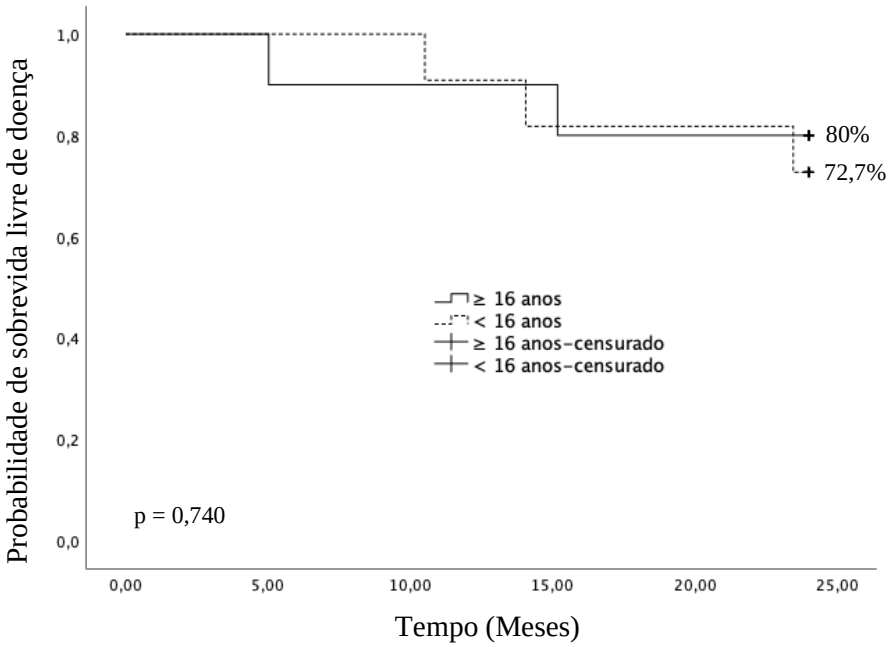
a) Sobrevida global em receptores de TCPH para tratamento da DF (n=21). b) Sobrevida global em receptores de TCPH para tratamento da DF, de acordo com a idade. TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; DF, doença falciforme.

Figura 5 - Sobrevida livre de doença em 24 meses pós-TCPH para tratamento da DF

a)



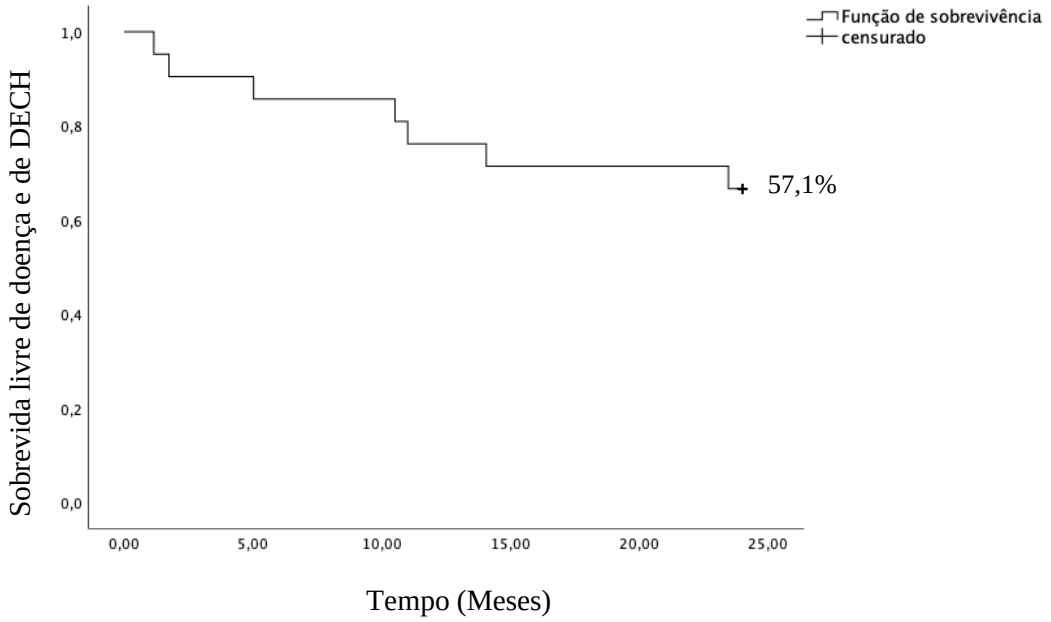
b)



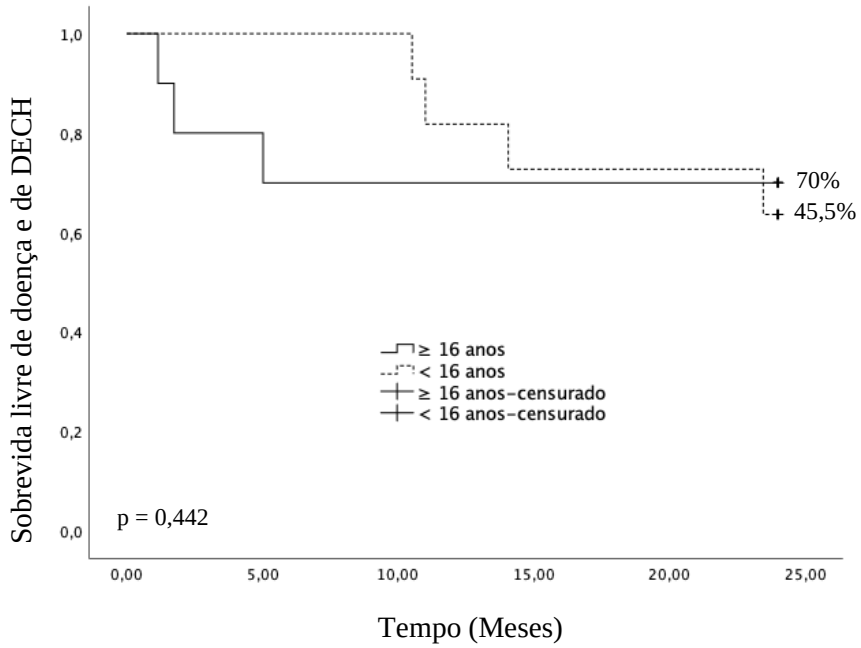
a) Sobrevida livre de doença em receptores de TCPH para tratamento de DF (n=21). b) Sobrevida livre de doença em receptores de TCPH para tratamento de DF, de acordo com a idade. TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; DF, doença falciforme.

Figura 6 - Sobrevida livre de doença e livre de DECH (GRFS) em 24 meses pós-TCPH para tratamento da DF

a)



b)



a) GRFS em receptores de TCPH para tratamento de DF (n=21). b) GRFS em receptores de TCPH para tratamento de DF, de acordo com a idade. TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; DF, doença falciforme.

5.4 Avaliação de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial após o transplante de células progenitoras hematopoétitcas

A mediana e os intervalos interquartis (IIQ) dos níveis séricos dos 21 marcadores relacionados à ativação e à disfunção endotelial nos períodos pré-TCPH, 1 mês, 6 meses e 24 meses pós-TCPH de cada paciente (n=21) estão descritos no Apêndice B. Na avaliação pré-TCPH, não foram observadas diferenças significativas em relação à indicação neurológica ou outras indicações para o TCPH e em relação à presença ou à ausência de falha de enxertia secundária nos primeiros 24 meses pós-TCPH (Tabelas 8-10). Apenas o marcador FvW-A2 teve níveis séricos diferentes entre os subgrupos relacionados à idade na avaliação pré-TCPH, com valores maiores nos pacientes com menos de 16 anos (p=0,013) (Tabela 8).

Na avaliação realizada 24 meses após o TCPH, os seguintes marcadores tiveram níveis sérico aumentados nos pacientes com falha de enxertia, em relação aos níveis séricos dos pacientes com enxerto funcionante: TNF-α (p=0,042); IL-33 (p=0,047); CD163 (p=0,023); pentraxina-3 (p=0,015); D-dímero (p=0,030) e E-selectina (p=0,010) (Tabela 10).

Tabela 8 - Análise de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial antes do TCPH no grupo estudo, de acordo com a idade

Marcadores, mediana (IIQ)	**≥ 16 anos (n = 10)**	**< 16 anos (n = 11)**	**Valor P**
TNF-α (pg/ml)	46,7 (41,3-60,3)	52,3 (44,0-64,6)	0,438
IL-6 (pg/ml)	12,1 (9,4-14,9)	13,2 (11,7-17,9)	0,158
IL-33 (pg/ml)	64,7 (53,9-73,3)	72,6 (64,5-90,4)	0,057
FvW-A2 (pg/ml)	325,8 (279,9-356,8)	367,4 (361,2-475,4)	**0,013**
ST2 (ng/ml)	16,7 (10,6-21,4)	16,9 (11,0-45,0)	0,888
VEGF-A (pg/ml)	78,5 (69,1-88,9)	90,7 (75,1-104,1)	0,168
IL-6Rα (ng/ml)	39,1 (30,7-45,7)	42,4 (36,0-49,2)	0,341
CD163 (ng/ml)	332,1 (258,8-610,7)	573,9 (265,1-933,5)	0,181
Pentraxina-3 (ng/ml)	1,1 (0,9-1,8)	1,5 (1,3-1,8)	0,243
HGF (pg/ml)	264,8 (182,0-410,2)	255,7 (204,6-330,8)	0,833
D-dímero (µg/ml)	9,7 (7,7-13,5)	9,2 (7,0-14,7)	0,860
E-selectina (ng/ml)	46,4 (39,6-58,6)	73,2 (48,9-100,5)	0,057
Trombomodulina (ng/ml)	4,3 (3,6-4,9)	4,8 (4,6-6,2)	0,192
P-selectina (ng/ml)	33,8 (27,7-39,3)	41,1 (30,8-52,2)	0,072
Reg3A (pg/ml)	5.508 (4.911-7.414)	4.044 (3.126-6.766)	0,306
CXCL4 (ng/ml)	458,9 (23,1-1.784,6)	431,9 (125,4-1.327,8)	0,888
VCAM-1 (ng/ml)	2.183,4 (1.407,9-3.308,9)	2.811,7 (1.918,9-4.182,4)	0,307
ICAM-1 (ng/ml)	445,5 (362,9-622,8)	566,4 (359,4-778,2)	0,418
TNF-RI (pg/ml)	1.201,1 (982,6-1.727,2)	1.170,5 (936,4-1.366,0)	0,751
Endotelina-1 (pg/ml)	19,9 (18,1-23,7)	20,4 (19,5-23,4)	0,322
IL-18 (pg/ml)	470,1 (214,5-620,3)	595,7 (349,9-825,4)	0,205

TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; IIQ, intervalo interquartil

Tabela 9 - Análise de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial antes do TCPH no grupo estudo, de acordo com a indicação para o procedimento

Marcadores, mediana (IIQ)	Sem indicação neurológica (n = 9)	Com indicação neurológica (n = 12)	Valor P
TNF-α (pg/ml)	54,3 (46,7-62,5)	45,3 (37,7-53,8)	0,109
IL-6 (pg/ml)	13,9 (9,6-15,2)	12,9 (11,5-17,2)	0,644
IL-33 (pg/ml)	72,6 (64,6-77,7)	67,8 (55,8-78,7)	0,454
FvW-A2 (pg/ml)	349,0 (325,8-404,5)	364,3 (289,0-456,6)	0,887
ST2 (ng/ml)	17,5 (10,6-22,1)	16,4 (11,7-44,6)	0,776
VEGF-A (pg/ml)	87,7 (74,4-91,5)	86,2 (63,6-101,1)	0,972
IL-6Rα (ng/ml)	39,8 (32,2-46,4)	40,4 (36,0-48,6)	0,803
CD163 (ng/ml)	309,3 (265,7-774,9)	559,5 (321,7-907,9)	0,320
Pentraxina-3 (ng/ml)	1,4 (1,1-1,6)	1,3 (1,0-2,2)	1,000
HGF (pg/ml)	314,2 (208,3-557,3)	242,9 (180,0-324,0)	0,286
D-dímero (µg/ml)	12,5 (9,0-13,7)	7,7 (5,8-13,3)	0,081
E-selectina (ng/ml)	53,3 (45,6-60,3)	52,5 (35,6-95,2)	0,943
Trombomodulina (ng/ml)	3,8 (3,6-4,8)	5,2 (4,6-6,2)	0,135
P-selectina (ng/ml)	38,1 (33,8-44,5)	35,2 (23,4-47,7)	0,433
Reg3A (pg/ml)	6.000 (4.178-8.583)	4.768 (3.504-6.173)	0,255
CXCL4 (ng/ml)	623,9 (271,8-2.209,1)	269,7 (70,1-1.120,3)	0,177
VCAM-1 (ng/ml)	2.429,8 (1.593,5-2.811,7)	3.331,4 (1.659,7-4.302,4)	0,255
ICAM-1 (ng/ml)	571,3 (434,1-633,6)	445,4 (337,2-725,2)	0,414
TNF-RI (pg/ml)	1.111,7 (876,3-1.686,3)	1.232,5 (1.131,0-1.496,8)	0,455
Endotelina-1 (pg/ml)	20,4 (19,9-28,5)	19,7 (18,4-21,8)	0,125
IL-18 (pg/ml)	510,4 (283,1-681,4)	575,9 (335,3-825,5)	0,394

TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas, IIQ, intervalo interquartil

Tabela 10 - Análise de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial no grupo estudo, de acordo com a presença de falha de enxertia ou de enxerto funcionante.

Marcadores, mediana (IIQ)	Pré-TCPH		Valor P	24 meses Pós-TCPH		Valor P
	Enxerto funcionante (n = 16)	Falha de enxertia (n = 5)		Enxerto funcionante (n = 16)	Falha de enxertia (n = 4)	
TNF-α (pg/ml)	47,6 (0,4-58,8)	54,3 (47,8-65,9)	0,282	43,6 (38,3-48,1)	54,8 (47,3-71,4)	**0,042**
IL-6 (pg/ml)	13,6 (10,7-15,5)	12,3 (10,9-17,0)	0,967	9,8 (9,0-12,6)	12,5 (11,8-27,1)	0,089
IL-33 (pg/ml)	71,2 (58,1-78,7)	72,6 (63,5-83,9)	0,619	59,6 (50,3-66,1)	71,9 (63,1-92,4)	**0,047**
FvW-A2 (pg/ml)	364,3 (317,6-421,7)	349,0 (315,0-444,1)	0,772	352,0 (278,0-430,8)	394,1 (346,4-485,4)	0,298
ST2 (ng/ml)	15,2 (10,7-20,7)	43,5 (13,8-68,8)	0,215	12,4 (10,6-15,8)	17,0 (13,1-18,8)	0,130
VEGF-A (pg/ml)	83,3 (68,7-91,9)	92,3 (81,4-123,0)	0,090	68,4 (64,7-94,9)	87,9 (78,8-96,4)	0,155
IL-6Rα (ng/ml)	40,5 (31,6-48,7)	39,8 (37,3-47,6)	0,710	45,5 (40,1-48,7)	45,3 (40,4-52,1)	0,705
CD163 (ng/ml)	374,2 (251,9-566,7)	933,5 (526,1-1.230,2)	0,052	373,6 (313,8-702,1)	1.389,8 (688,3-1.663,7)	**0,023**
Pentraxina-3 (ng/ml)	1,3 (1,0-1,6)	1,6 (1,3-16,0)	0,171	0,9 (0,7-1,1)	1,5 (1,1-2,3)	**0,015**
HGF (pg/ml)	249,3 (196-382,8)	283,4 (194,0-1.706,8)	0,901	170,9 (137,7-232,7)	188,2 (164,5-242,1)	0,508
D-dímero (µg/ml)	8,3 (7,1-13,9)	11,2 (8,8-14,0)	0,302	3,6 (2,5-8,3)	11,0 (5,6-13,6)	**0,030**
E-selectina (ng/ml)	57,1 (41,9-77,7)	50,6 (34,0-85,0)	0,680	41,2 (32,7-42,6)	54,2 (49,8-107,8)	**0,010**
Trombomodulina (ng/ml)	4,7 (3,8-6,2)	4,7 (3,7-5,3)	0,620	6,8 (5,4-7,6)	8,6 (5,6-10,5)	0,394
P-selectina (ng/ml)	36,1 (28,9-45,4)	41,1 (33,8-54,7)	0,246	34,8 (26,1-40,4)	43,2 (31,1-57,9)	0,185
Reg3A (pg/ml)	5.234,0 (3.504,5-6.843,0)	6.426,0 (4.025,0-6.652,0)	0,741	7.004,0 (5323,0-9063,0)	10.881,0 (7.853,5-12.027,5)	0,058
CXCL4 (ng/ml)	423,0 (81,8-1.343,9)	517,4 (111,1-990,0)	0,804	727,3 (469,9-1146,8)	496,7 (122,9-720,5)	0,219
VCAM-1 (ng/ml)	2.667,0 (1.507,0-3.832,4)	2.429,8 (1.772,9-3.947,9)	0,869	927,6 (734,8-1346,8)	2.240,3 (1.001,8-3.242,3)	0,059
ICAM-1 (ng/ml)	441,6 (337,2-601,8)	581,2 (549,9-737,3)	0,083	479,2 (278,0-645,4)	720,4 (521,3-745,6)	0,143
TNF-RI (pg/ml)	1.160,9 (961,8-1.360,2)	1.413,7 (979,6-1.624,1)	0,509	1.160,6 (1008,0-1540,5)	1.780,9 (981,0-2.704,5)	0,256
Endotelina-1 (pg/ml)	20,0 (19,1-21,9)	20,4 (20,2-28,8)	0,198	18,9 (18,3-20,3)	21,8 (19,2-24,6)	0,058
IL-18 (pg/ml)	523,9 (379,7-792,9)	349,9 (216,5-771,3)	0,409	187,4 (143,3-293,0)	460,7 (238,8-1.006,8)	0,059

TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; IIQ, intervalo interquartil.

5.5 Avaliação de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial nos pacientes com enxerto funcionante

A análise comparativa entre os períodos relacionados ao TCPH (pré-TCPH, 1 mês, 6 meses e 24 meses pós-TCPH) nos pacientes com enxerto funcionante demonstrou diferenças significativas entre pelo menos dois dos quatro períodos nos seguintes marcadores: IL-33, VEGF-A, IL-6Rα, CD163, Pentreaxina-3, HGF, D-dímero, E-selectina, trombomodulina, P-selectina, Reg3A, CXCL4, VCAM-1, TNF-RI, endotelina e IL-18 (Tabela 11).

As Figuras 7-13 demonstram as diferenças dos níveis séricos dos marcadores entre os períodos relacionados ao TCPH. Em relação ao período pré-TCPH, oito marcadores (IL-33; pentraxina-3; IL-18; E-selectina; VCAM-1; endotelina; HGF e D-dímero) apresentaram redução e dois marcadores (trombomodulina e Reg3A) apresentaram aumento dos níveis séricos, 24 meses após o TCPH.

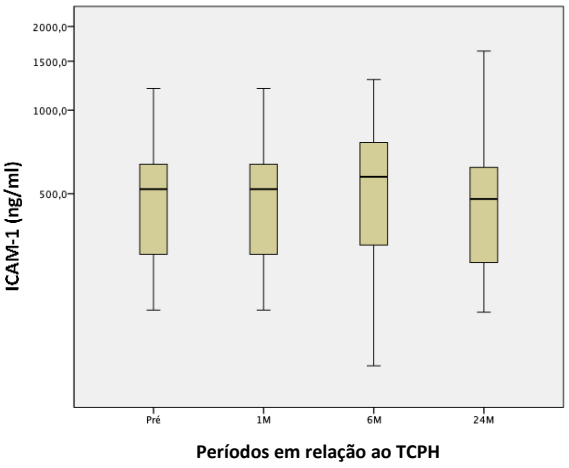
Tabela 11 - Análise de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial nos pacientes com enxerto funcionante (n=16).

Marcadores, mediana (IIQ)	Pré-TCPH	1 mês pós-TCPH	6 meses pós-TCPH	24 meses pós-TCPH	Valor P
TNF-α (pg/ml)	47,6 (40,8 - 58,8)	40,7 (33,2 - 46)	47,1 (44,9 - 52,3)	43,6 (38,3 - 48)	0,103
IL-6 (pg/ml)	13,5 (10,6 - 15,5)	12,1 (9 - 16,7)	11,8 (10,4 - 15,5)	9,8 (9 - 12,6)	0,125
IL-33 (pg/ml)	71,2 (58,1 - 78,7)	55 (44,6 - 65,4)	69,8 (53,4 - 76,5)	59,6 (50,3 - 66,1)	**0,006**
FvW-A2 (pg/ml)	364,3 (317,5 - 421,7)	370,6 (326 - 445,8)	377 (349 - 475,4)	352 (278 - 430,8)	0,633
ST2 (ng/ml)	15,1 (10,7 - 20,7)	15 (8,8 - 34)	14,1 (11,3 - 17,3)	12,4 (10,6 - 15,8)	0,312
VEGF-A (pg/ml)	83,3 (68,7 - 91,9)	60,2 (52,8 - 70,7)	75,8 (67,1 - 87,7)	68,3 (64,6 - 94,8)	**0,003**
IL-6Rα (ng/ml)	40,4 (31,6 - 48,6)	42,3 (36,3 - 46)	46 (39,8 - 48,2)	45,4 (40,1 - 48,6)	**0,031**
CD163 (ng/ml)	374,1 (251,9 - 566,7)	554,6 (232,7 - 1145,1)	531,7 (302,7 - 1057,9)	373,6 (313,8 - 702,1)	**0,007**
Pentraxina-3 (ng/ml)	1,3 (1 - 1,6)	2,9 (1,3 - 4,5)	1,5 (1 - 1,7)	0,9 (0,7 - 1,1)	**< 0,001**
HGF (pg/ml)	249,3 (196 - 382,7)	281,25 (164,4 - 928,3)	215,4 (169,4 - 260,2)	170,8 (137,7 - 232,7)	**0,006**
D-dímero (µg/ml)	8,3 (7,1 - 13,8)	8,9 (6,4 - 9,8)	6,1 (4,5 - 7,4)	3,6 (2,4 - 8,3)	**0,001**
E-selectina (ng/ml)	57,1 (41,9 - 77,7)	36,5 (26,4 - 45,6)	44,8 (33,5 - 52,3)	41,2 (32,6 - 42,6)	**0,001**
Trombomodulina (ng/ml)	4,7 (3,8 - 6,1)	5,9 (5,4 - 7,7)	8,1 (6,8 - 9,7)	6,8 (5,4 - 7,5)	**< 0,001**
P-selectina (ng/ml)	36,1 (28,8 - 45,4)	27,7 (17,5 - 37,1)	35,4 (29,7 - 51,7)	34,7 (26,1 - 40,3)	**0,003**
Reg3A (pg/ml)	5.234 (3.504 - 6843)	5.557 (4.349 - 9710)	8.103 (5.955 – 13.400)	7.004 (5.323 – 9.063)	**< 0,001**
CXCL4 (ng/ml)	423 (81,825 - 1343,925)	78,7 (11,725 - 341,7)	607,05 (185,5 - 1009,1)	727,2 (469,9 - 1146,7)	**0,002**
VCAM-1 (ng/ml)	2.667,4 (1.507 – 3.832,4)	2.642,5 (1.300 – 3.694,4)	1381,1 (1098,8 - 1677,7)	927,6 (734,8 - 1346,7)	**< 0,001**
ICAM-1 (ng/ml)	441,6 (337,2 - 601,75)	520,3 (284,7 - 659,1)	576,2 (306,5 - 793)	479,1 (277,9 - 645,4)	0,107
TNF-RI (pg/ml)	1160,9 (961,8 - 1360,2)	1664,2 (1308,8 - 1909,3)	1830 (1396,6 - 2172)	1160,5 (1007,9 - 1540,5)	**< 0,001**
Endotelina-1 (pg/ml)	19,9 (19 - 21,8)	18,8 (17,6 - 20,1)	20,6 (18,3 - 22,5)	18,8 (18,3 - 20,2)	**0,034**
IL-18 (pg/ml)	523,9 (379,6 - 792,8)	330,9 (240,2 - 483,1)	222,2 (156,2 - 463,5)	187,35 (143,3 - 292,9)	**< 0,001**

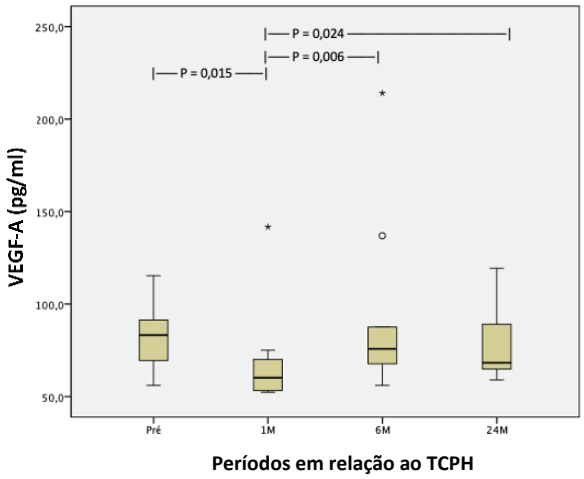
TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; IIQ, intervalo interquartil

Figura 7 - Avaliação dos níveis séricos de ICAM-1 (a), VEGF-A (b) e P-selectina (c) nos pacientes com enxerto funcionante (n=16).

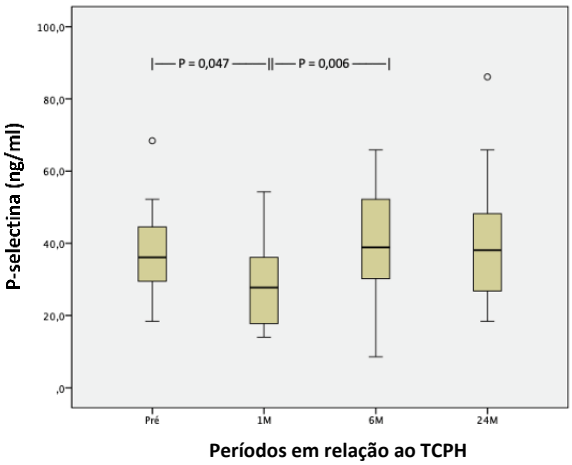
a)



b)



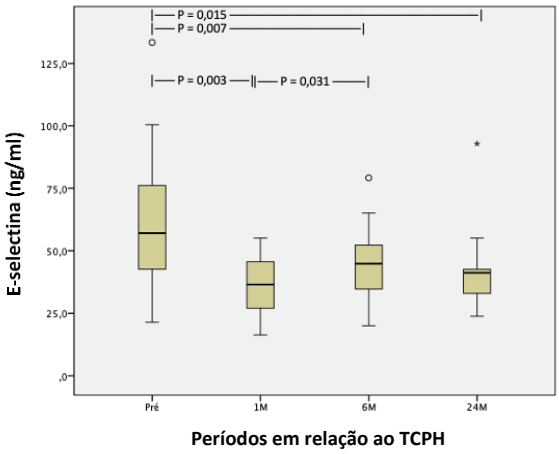
c)



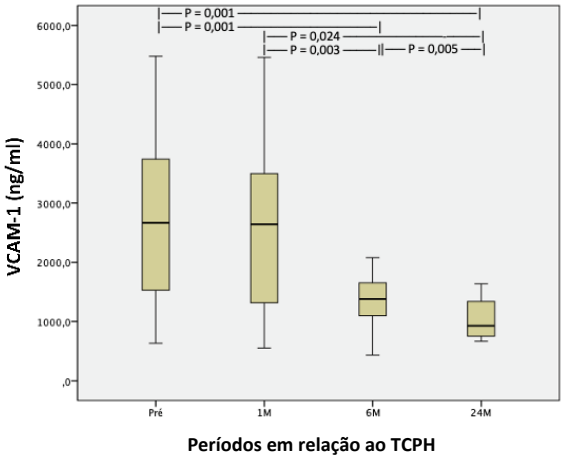
TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; Pré, período pré-TCPH; M, mês pós-TCPH.

Figura 8 - Avaliação dos níveis séricos de E-selectina (a), VCAM-1 (b) e endotelina-1 (c) nos pacientes com enxerto funcionante (n=16).

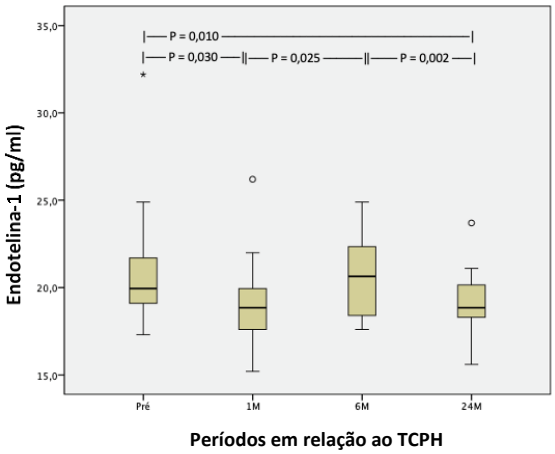
a)



b)



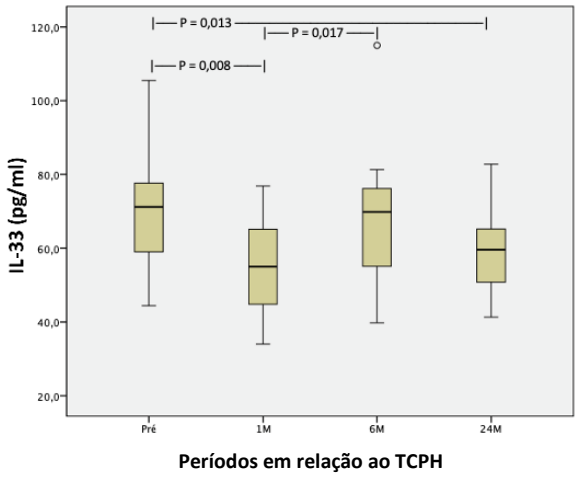
c)



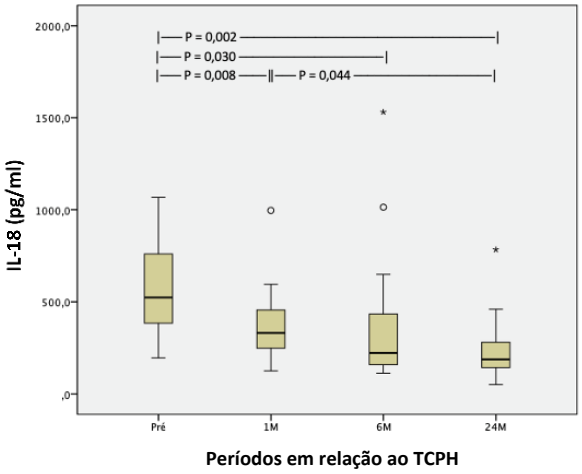
TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; Pré, período pré-TCPH; M, mês pós-TCPH.

Figura 9 - Avaliação dos níveis séricos de IL-33 (a), IL-18 (b) e IL-6Rα (c) nos pacientes com enxerto funcionante (n=16).

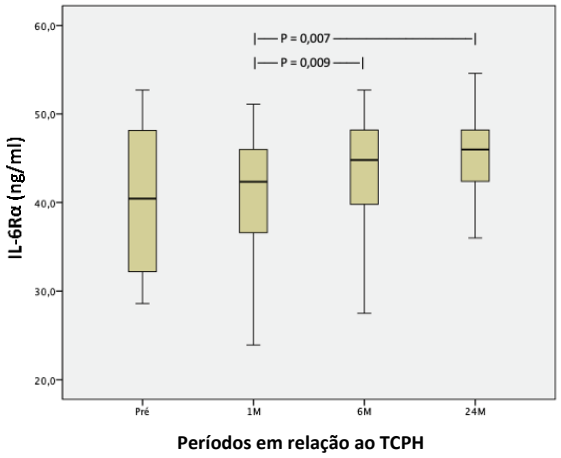
a)



b)



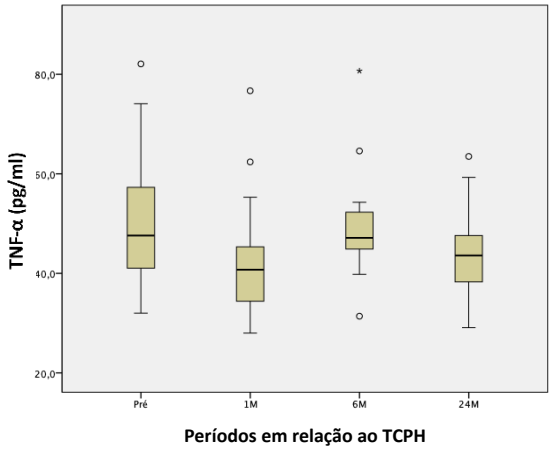
c)



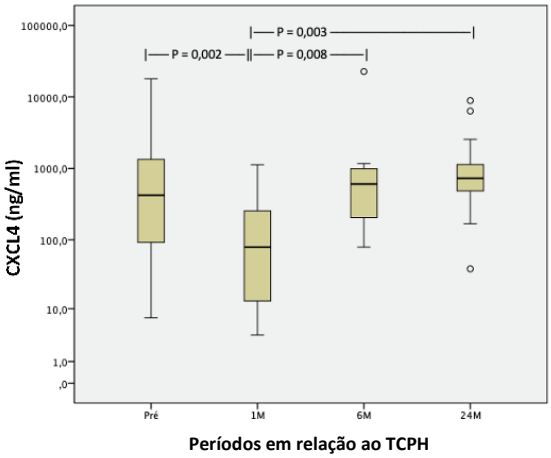
TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; Pré, período pré-TCPH; M, mês pós-TCPH.

Figura 10 - Avaliação dos níveis séricos de TNF-α (a), CXCL4 (b) e CD163 (c) nos pacientes com enxerto funcionante (n=16).

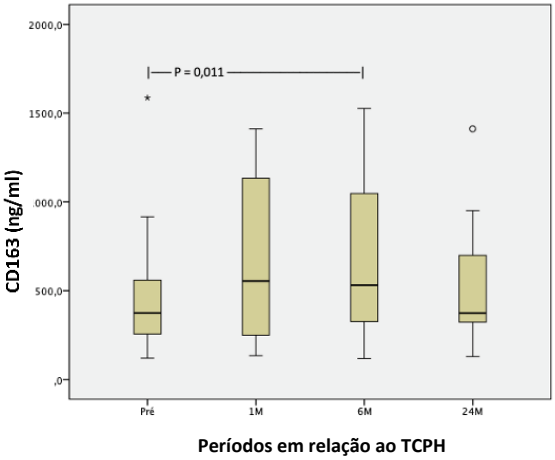
a)



b)



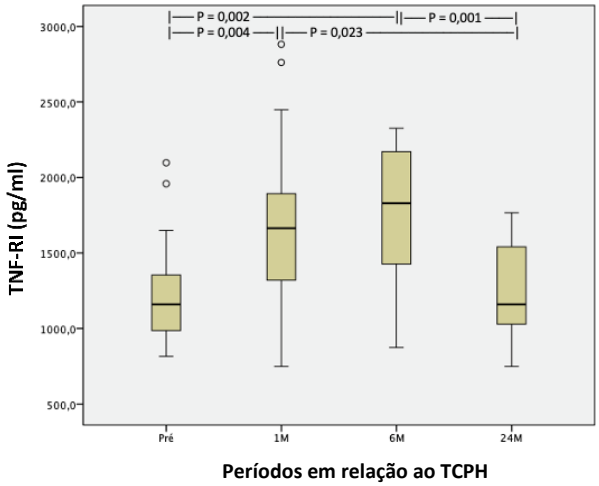
c)



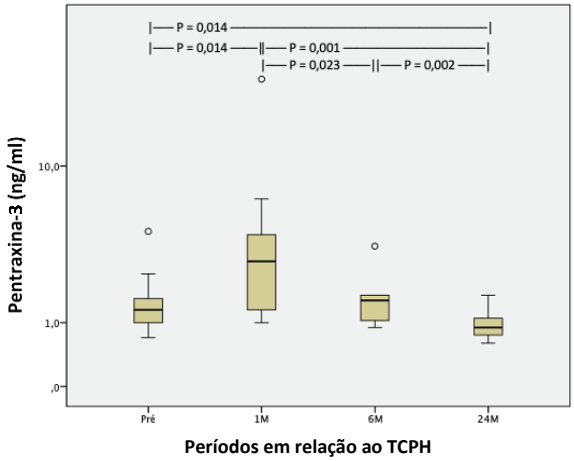
TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; Pré, período pré-TCPH; M, mês pós-TCPH.

Figura 11 - Avaliação dos níveis séricos de TNF-RI (a), pentraxina-3 (b) e IL-6 (c) nos pacientes com enxerto funcionante (n=16).

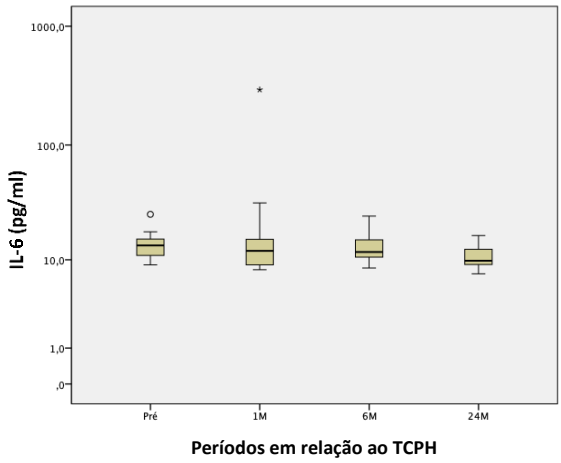
a)



b)



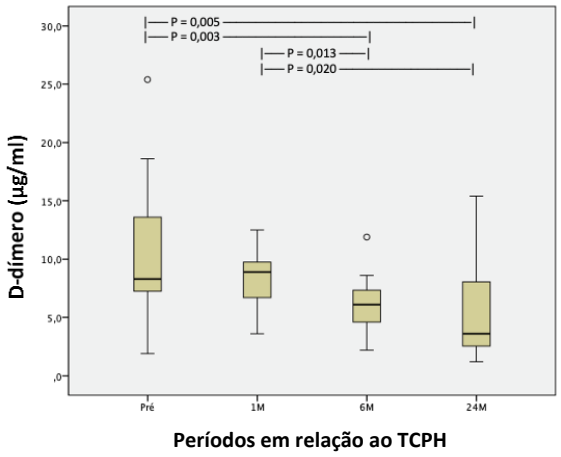
c)



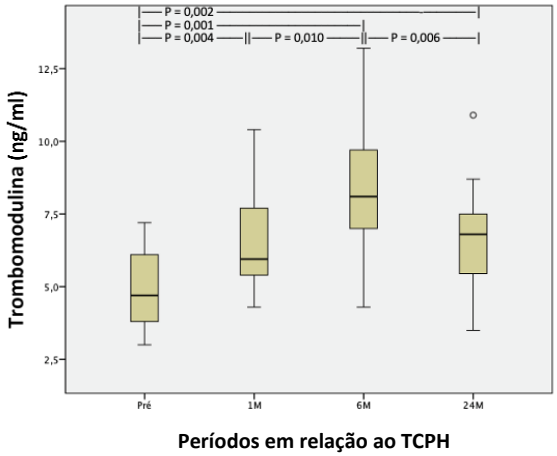
TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; Pré, período pré-TCPH; M, mês pós-TCPH.

Figura 12 - Avaliação dos níveis séricos de D-dímero (a), trombomodulina (b) e FvW-A2 (c) nos pacientes com enxerto funcionante (n=16).

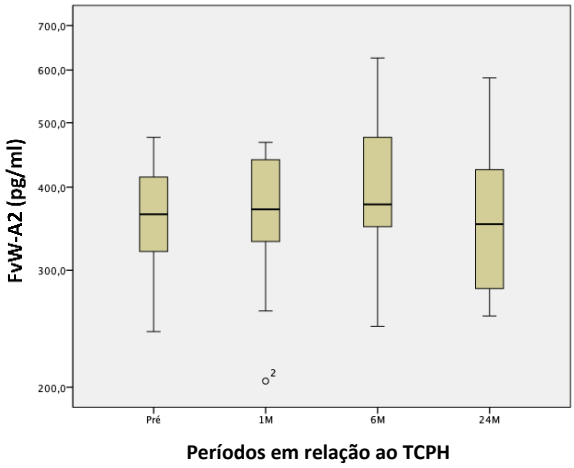
a)



b)



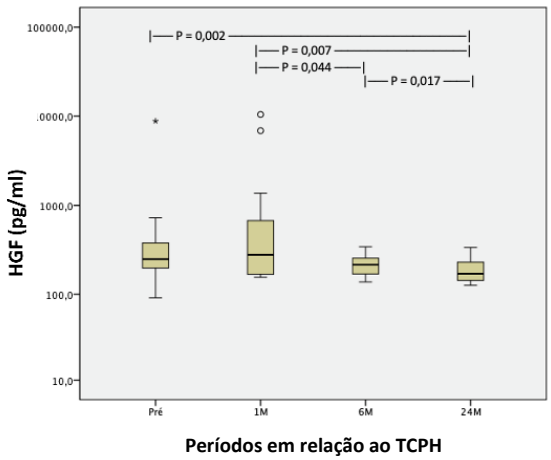
c)



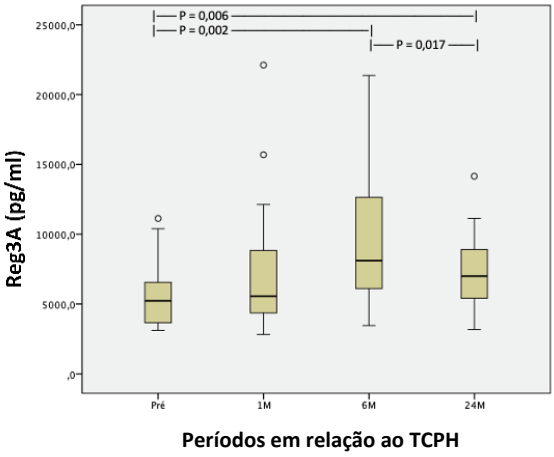
TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; Pré, período pré-TCPH; M, mês pós-TCPH.

Figura 13 - Avaliação dos níveis séricos de HGF (a), Reg3A (b) e ST2 (c) nos pacientes com enxerto funcionante (n=16).

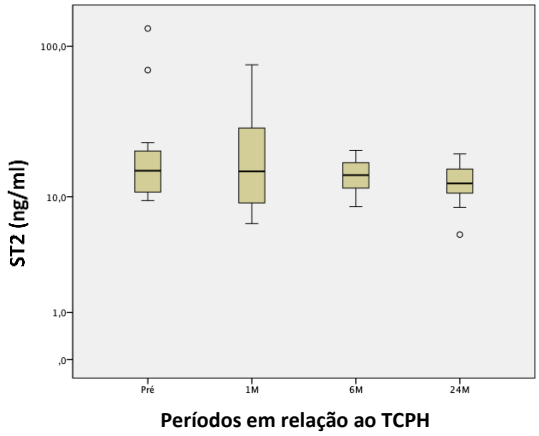
a)



b)



c)



TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; Pré, período pré-TCPH; M, mês pós-TCPH.

No período pré-TCPH, os marcadores FvW-A2 e E-selectina tiveram níveis séricos maiores nos pacientes menores de 16 anos (p=0,036), não apresentando diferença aos 24 meses pós-TCPH (Tabela 12). Não houve diferença entre os níveis séricos dos marcadores pré-TCPH e 24 meses após o transplante, de acordo com a indicação para o procedimento (Tabela 13). Os pacientes com DECH aguda tiveram níveis séricos do marcador Reg3A maiores em relação aos pacientes que não tiveram DECH aguda, no período pré-TCPH (p=0,026) e 24 meses pós-TCPH (p=0,044) (Tabela 14).

Não houve diferença entre os níveis séricos dos marcadores no período pré-TCPH, em relação à compatibilidade do sistema sanguíneo ABO entre doador e receptor, porém, 24 meses após o TCPH, os níveis séricos dos marcadores IL-6, HGF, D-dímero e P-selectina foram menores nos pacientes que eram isogrupos com seus respectivos doadores ou que tinham incompatibilidade ABO maior, em relação aos que tinham incompatibilidade menor ou bidirecional (p=0,044; p=0,012; p=0,044; p=0,039, respectivamente) (Tabela 15).

Tabela 12 - Análise de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial, de acordo com a faixa etária, nos pacientes com enxerto funcionante.

Marcadores, mediana (IIQ)	Pré-TCPH		Valor P	24 meses pós-TCPH		Valor P
	≥ 16 anos (n = 8)	< 16 anos (n = 8)		≥ 16 anos (n = 8)	< 16 anos (n = 8)	
TNF-α (pg/ml)	46,7 (40,8 - 58,3)	49,5 (38,6 - 62)	0,713	42,3 (33,3 - 56,6)	44,4 (38,6 - 46,7)	0,752
IL-6 (pg/ml)	12,1 (9,1 - 15,1)	13,8 (11,9 - 17,3)	0,206	11 (9,1 - 14,6)	9,5 (8,4 - 11,6)	0,247
IL-33 (pg/ml)	59 (51,8 - 74,4)	73,3 (66,1 - 87,7)	0,051	53,9 (48,3 - 72,2)	62 (54,8 - 66,1)	0,399
FvW-A2 (pg/ml)	320,3 (271,6 - 369,5)	383,9 (362,7 - 463,7)	**0,027**	350,3 (270,9 - 430,8)	352 (301 - 434,7)	0,916
ST2 (ng/ml)	17,4 (11,5 - 22,7)	13,5 (9,95 - 19,5)	0,293	13,8 (10,8 - 15,8)	11,5 (8,9 - 17,4)	0,495
VEGF-A (pg/ml)	77,8 (64,5 - 87,7)	87,7 (69,6 - 92,3)	0,4	67,2 (62,7 - 77,7)	70,7 (65,7 - 108,7)	0,528
IL-6Rα (ng/ml)	37,3 (30,1 - 49,9)	40,4 (36,3 - 48,6)	0,4	46 (41,4 - 49,6)	44,2 (38,8 - 48,6)	0,752
CD163 (ng/ml)	332,1 (208,4 - 480)	518,4 (251,9 - 805,8)	0,345	373,6 (313,8 - 801,2)	515,9 (232,2 - 702,1)	0,958
Pentraxina-3 (ng/ml)	1,1 (0,8 - 2,2)	1,3 (1 - 1,5)	0,635	0,8 (0,7 - 1)	0,95 (0,7 - 1,1)	0,634
HGF (pg/ml)	264,8 (196 - 382,7)	249,3 (182,6 - 629,1)	0,834	175,4 (159,5 - 302,5)	165,2 (127,6 - 216,1)	0,318
D-dímero (µg/ml)	8,3 (7,5 - 13,7)	8,3 (5,8 - 14,3)	0,875	3,9 (2,3 - 6,8)	3,1 (2,5 - 8,8)	0,833
E-selectina (ng/ml)	44,8 (36,3 - 59,7)	76,2 (50,7 - 98,6)	**0,036**	39,1 (29,3 - 51,6)	41,2 (35 - 42,6)	0,525
Trombomodulina (ng/ml)	4,7 (3,5 - 5,1)	5,3 (4 - 6,2)	0,563	7,2 (6,4 - 7,5)	5,8 (4,8 - 8,3)	0,371
P-selectina (ng/ml)	32,4 (21,5 - 41,6)	40,3 (28,8 - 50,7)	0,268	36 (27,2 - 37,7)	30,9 (25,2 - 45)	0,674
Reg3A (pg/ml)	5508 (4625 - 9031,5)	4009 (3181,5 - 6696,5)	0,225	6888 (5808 - 9063)	7004 (4718 - 10007,5)	0,636
CXCL4 (ng/ml)	688 (14,4 - 2655,2)	423 (125,4 - 1104,2)	0,916	769 (263,3 - 1116,7)	727,2 (469,9 - 5407,9)	0,529
VCAM-1 (ng/ml)	2667,4 (1253,9 - 3718,7)	2575,1 (1659,7 - 4146,5)	0,713	1054,5 (842,1 - 1346,7)	806,8 (688,4 - 1351,1)	0,294
ICAM-1 (ng/ml)	434,1 (264,1 - 492,2)	506,4 (337,2 - 887,4)	0,372	449,8 (279,2 - 494,8)	576,2 (254,7 - 859,6)	0,462
TNF-RI (pg/ml)	1201,1 (1056,4 - 1881,6)	1131 (889,7 - 1320,5)	0,371	1355,5 (1150,6 - 1580,8)	1030 (936,7 - 1265,7)	0,082
Endotelina-1 (pg/ml)	19,3 (17,7 - 20,7)	20,9 (19,5 - 23)	0,155	18,7 (16,9 - 20,5)	19,2 (18,3 - 20,2)	0,493
IL-18 (pg/ml)	470,1(255,9 - 530,6)	677,7 (434,9 - 980,1)	0,074	187,3 (154,1 - 250,6)	170,9 (139,7 - 367,1)	0,793

TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; IIQ, intervalo interquartil

Tabela 13 - Análise de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial nos pacientes com enxerto funcionante, de acordo com a indicação para o procedimento.

Marcadores, mediana (IIQ)	Período pré-TCPH		Valor P	24 meses pós-TCPH		Valor P
	Sem indicação neurológica (n = 6)	Com indicação neurológica (n = 10)		Sem indicação neurológica (n = 6)	Com indicação neurológica (n = 10)	
TNF-α (pg/ml)	56,3 (47,6 - 66,9)	42,7 (36,6 - 52,8)	0,057	47,6 (41,2 - 60,3)	40,6 (36,9 - 45,3)	0,092
IL-6 (pg/ml)	14,2 (9 - 16,1)	12,9 (11,3 - 15,9)	0,913	9,4 (8,8 - 13,3)	10,3 (8,9 - 12,7)	0,745
IL-33 (pg/ml)	73,3 (59,9 - 82,4)	67,8 (53,9 - 76,5)	0,414	59,6 (54 - 78,3)	56,8 (49,3 - 64,2)	0,446
FvW-A2 (pg/ml)	358,7 (323 - 440,4)	364,3 (279,8 - 419,1)	0,744	397,3 (334,8 - 473,2)	328,7 (269,8 - 385,7)	0,129
ST2 (ng/ml)	16,1 (10,6 - 21,4)	15,1 (10,6 - 32,8)	1,000	11 (10,2 - 13,5)	13,5 (10,2 - 18,5)	0,278
VEGF-A (pg/ml)	84,8 (73,2 - 92,3)	79,9 (61,6 - 92,3)	0,550	72,7 (63,8 - 113,4)	67,7 (63,9 - 83,4)	0,550
IL-6Rα (ng/ml)	38,5 (30,7 - 45,8)	40,4 (34,7 - 49,9)	0,625	46 (41,4 - 47,6)	44,2 (38,8 - 49,6)	0,744
CD163 (ng/ml)	296,6 (231,4 - 364,5)	527 (257,5 - 891,4)	0,104	373,6 (322,9 - 757,6)	515,9 (275,9 - 738,1)	0,957
Pentraxina-3 (ng/ml)	1,35 (1 - 1,8)	1,3 (0,9 - 1,7)	0,624	0,8 (0,7 - 1)	0,9 (0,6 - 1,1)	0,870
HGF (pg/ml)	343,6 (211,8 - 471,6)	223,7 (171 - 368,7)	0,233	208 (166,5 - 279,7)	160,8 (129,8 - 195)	0,115
D-dímero (µg/ml)	12,8 (8,1 - 15,2)	7,5 (5,2 - 10,5)	0,092	4,35 (2,5 - 10,3)	3,15 (2,4 - 7,8)	0,550
E-selectina (ng/ml)	59,2 (43,3 - 68,4)	52,5 (37,4 - 84,5)	0,828	43,4 (35,1 - 64,5)	40,5 (31,7 - 41,5)	0,209
Trombomodulina (ng/ml)	4,2 (3,7 - 4,9)	5,3 (4,2 - 6,5)	0,302	7,2 (6,4 - 7,6)	5,85 (5 - 7,8)	0,355
P-selectina (ng/ml)	40,4 (33,2 - 51,8)	30,8 (20,9 - 42,4)	0,141	36,7 (28,2 - 52,3)	30,9 (24 - 39,1)	0,232
Reg3A (pg/ml)	6.562 (4.983 – 10.314)	4.263 (3.292 – 5.414)	0,064	7.483 (5.509 – 9.992)	7.004 (4.718 – 9.555)	0,664
CXCL4 (ng/ml)	1.151,7 (307 – 6.794,8)	269,7 (53 - 662,3)	0,193	769 (453,7 - 2431,8)	727,2 (404,8 – 1.507)	0,914
VCAM-1 (ng/ml)	2.667 (1.407 – 3.089)	2.721 (1.454 – 4.416)	0,664	1.223 (823,8 – 1.378,8)	827,8 (706,4 – 1.297,9)	0,278
ICAM-1 (ng/ml)	474,1 (373,7 - 581,4)	426,9 (291,8 - 814,6)	0,704	479,1 (388,3 - 610,1)	397,8 (261,8 - 731)	0,828
TNF-RI (pg/ml)	1074,8 (906,3 - 1993,6)	1201,1 (1066,8 - 1348,6)	0,704	1419 (1131,5 - 1637,5)	1112,4 (969,5 - 1263)	0,102
Endotelina-1 (pg/ml)	20,6 (19,4 - 26,7)	19,5 (18,1 - 21,5)	0,174	19,5 (18,1 - 21,7)	18,6 (18,2 - 19,6)	0,276
IL-18 (pg/ml)	510,4 (335,1 - 609,4)	608,2 (374,7 - 909,6)	0,385	227,7 (171,1 - 486,8)	148,4 (126 - 250)	0,092

TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; IIQ, intervalo interquartil

Tabela 14 - Análise de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial nos pacientes com enxerto funcionante, de acordo com a presença ou a ausência de DECH aguda.

Marcadores, mediana (IIQ)	Pré-TCPH		Valor P	24 meses pós-TCPH		Valor P
	Sem DECH aguda (n = 9)	Com DECH aguda (n = 7)		Sem DECH aguda (n = 9)	Com DECH aguda (n = 7)	
TNF-α (pg/ml)	46,7 (42,75 - 64,2)	52,3 (36,8 - 60,3)	0,791	44 (40,6 - 49,4)	38,3 (35,3 - 46,7)	0,289
IL-6 (pg/ml)	12,7 (9,25 - 16,2)	14,5 (11,7 - 15,6)	0,265	9,4 (8,3 - 12,5)	9,8 (9,2 - 15,3)	0,368
IL-33 (pg/ml)	71,2 (55,8 - 77,6)	71,2 (57,2 - 79,8)	0,831	56,1 (48,8 - 65,2)	60,8 (51,8 - 67,1)	0,396
FvW-A2 (pg/ml)	361,2 (299,4 - 437,9)	367,4 (325,8 - 428,8)	0,559	349 (269,8 - 447,8)	355 (320,3 - 380,3)	0,634
ST2 (ng/ml)	16,9 (10,1 - 46,7)	14 (11 - 20,4)	0,672	10,8 (8,7 - 14,7)	13,1 (11,4 - 19,1)	0,09
VEGF-A (pg/ml)	81,9 (66,8 - 90)	84,7 (67,8 - 97,2)	0,633	67,8 (64,4 - 77,7)	72,6 (64,4 - 115,4)	0,524
IL-6Rα (ng/ml)	43,6 (33,5 - 49,5)	37,2 (31 - 49,2)	0,458	46 (44,8 - 50)	41,1 (38,5 - 44,9)	0,08
CD163 (ng/ml)	491,7 (296,6 - 899,7)	247,5 (183,3 - 545,1)	0,101	373,6 (338,8 - 894,2)	354,9 (227,1 - 693,1)	0,339
Pentraxina-3 (ng/ml)	1,1 (0,7 - 2,4)	1,4 (1,1 - 1,6)	0,524	0,8 (0,6 - 1,1)	1 (0,8 - 1,1)	0,287
HGF (pg/ml)	215,4 (184,8 - 351,9)	314,2 (204,6 - 482,6)	0,368	163,6 (130,9 - 199,5)	184,5 (158,1 - 325,2)	0,152
D-dímero (µg/ml)	8,3 (7,25 - 14,4)	8,3 (5,4 - 13,1)	0,791	3 (2,3 - 3,9)	7,5 (2,9 - 8,9)	0,09
E-selectina (ng/ml)	48,9 (36,5 - 69,7)	60,3 (45,6 - 92,9)	0,289	41,2 (32,9 - 41,9)	41,2 (29,2 - 45,6)	0,873
Trombomodulina (ng/ml)	4,6 (3,6 - 5,4)	5,2 (3,8 - 6,3)	0,396	6,4 (5,2 - 7,9)	7,2 (6,2 - 7,4)	0,633
P-selectina (ng/ml)	38,1 (29,5 - 44,5)	30,8 (21,8 - 46,3)	0,71	34,1 (23 - 37,4)	36,7 (26,8 - 46,3)	0,34
Reg3A (pg/ml)	3.974 (3.126 – 5.508)	7.124 (4.482 – 10.392)	**0,026**	6.426 (4.718 – 7.864)	8.314 (6.884 – 11.132)	**0,044**
CXCL4 (ng/ml)	431,9 (233,8 - 2219,9)	125,4 (27,4 - 1327,8)	0,56	745,8 (527 - 1139,1)	548,9 (255,4 - 6355,6)	0,874
VCAM (ng/ml)	2811,7 (1330,9 - 4491)	2523 (1918,9 - 3558,8)	0,751	864 (736,2 - 1340,7)	1117,8 (715,4 - 1377)	0,634
ICAM (ng/ml)	441,6 (344,6 - 559,2)	449,3 (214,8 - 778,2)	0,634	426,7 (280,4 - 653,8)	498 (273,1 - 666,8)	0,711
TNF-RI (pg/ml)	1111,7 (845,2 - 1288)	1253,7 (1131 - 1958,9)	0,112	1150,6 (985,9 - 1170,5)	1540 (1074,2 - 1767)	0,079
Endotelina-1 (pg/ml)	20,4 (18,3 - 22,4)	19,5 (19,2 - 22)	1	18,7 (18,3 - 19,4)	19,5 (16,6 - 20,9)	0,873
IL-18 (pg/ml)	556,1 (510,4 - 950,3)	394,5 (315,6 - 695,2)	0,125	156,1 (115,9 - 382,7)	198,6 (143,3 - 256,9)	0,791

DECH, doença do enxerto contra o hospedeiro; TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; IIQ, intervalo interquartil

Tabela 15 - Análise de marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial nos pacientes com enxerto funcionante, de acordo com a compatibilidade do grupo sanguíneo ABO entre receptor e doador.

Marcadores, mediana, (IIQ)	Pré-TCPH		Valor P	24 meses pós-TCPH		Valor P
	Incompatibilidade menor e incompatibilidade bidirecional (n=6)	Isogrupo e incompatibilidade maior (n=10)		Incompatibilidade menor e incompatibilidade bidirecional (n=6)	Isogrupo e incompatiblidade maior (n=10)	
TNF-α (pg/ml)	48,15 (41,2-61,3)	47,6 (36,6-59,2)	0,871	44,1 (33,7-52,6)	43,6 (38,3-47,1)	0,957
IL-6 (pg/ml)	14,5 (13-15,375)	12,2 (9,3-17,9)	0,384	13,25 (9,6-15,6)	9,3 (8,3-11,1)	**0,044**
IL-33 (pg/ml)	64,2 (52,3-79,2)	71,2 (60,8-79,8)	0,414	56,3 (49,3-71,0)	59,6 (51,5-64,2)	0,957
vWF-A2 (pg/ml)	353,05 (261,2-407,5)	364,3 (331,6-475,4)	0,446	352 (307,6-431,2)	349,2 (273,2-442,0)	0,871
ST2 (ng/ml)	16,35 (12,4-48,1)	14,25 (10,3-21,1)	0,480	12,25 (10,7-16,6)	12,4 (8,85-16,0)	0,704
VEGF-A (pg/ml)	89,2 (70,3-93,5)	78,5 (66,4-88,8)	0,385	89,15 (63,0-113,4)	67,2 (64,6-73,8)	0,328
IL-6Rα (ng/ml)	32,2 (30,4-52,6)	43 (36,9-47,6)	0,447	41,75 (35,7-53,1)	46 (42,6-47,6)	0,586
CD163 (ng/ml)	320,45 (167,5-891,4)	423,3 (279,2-552,3)	0,515	524 (313,9-980,9)	373,6 (275,9-696,1)	0,624
Pentraxina-3 (ng/ml)	1,35 (0,9-1,8)	1,3 (0,9-1,7)	0,913	0,85 (0,7-1,1)	0,95 (0,75-1,15)	0,743
HGF (pg/ml)	350,1 (240,3-544,1)	210 (171-341,3)	0,129	245,65 (176,9-328,03)	158,12 (129,8-175,3)	**0,012**
D-dímero (µg/ml)	12,8 (8,1-15,6)	7,65 (5,2-10,4)	0,103	6,15 (3,75-10,3)	2,8 (2,3-5,1)	**0,044**
E-selectina (ng/ml)	47,25 (36,2-68,4)	59,2 (42,6-84,5)	0,356	31,05 (27,8-47,9)	41,2 (39,1-42,6)	0,189
Trombomodulina (ng/ml)	4,25 (3,0-4,9)	5,35 (4,4-6,5)	0,128	6,8 (4,9-7,4)	6,8 (5,4-8,4)	0,514
P-selectina (ng/ml)	38,55 (27,7-51,8)	36,1 (26,6-41,5)	0,549	38,9 (34,2-70,9)	28,2 (24,0-36,0)	**0,039**
Reg3A (pg/ml)	6089 (4198,5-10314,5)	4729 (3126-5701,5)	0,231	7719 (5381-10451)	6768 (5102-9096)	0,515
CXCL4 (ng/ml)	694,9 (23,0-1333,1)	416,1 (110,8-6327,8)	0,828	1124,85 (453,7-3512,7)	654,05 (404,8-985)	0,278
VCAM-1 (ng/ml)	3367,65 (2051-4416,8)	2128,7 (1407,9-3217,7)	0,302	913,05 (694,3-1202,6)	1067,7 (773,6-1359,0)	0,515
ICAM-1 (ng/ml)	438 (197,9-659,4)	441,6 (352-653,4)	0,745	485,5 (271,9-659,4)	456 (279,9-681,7)	1,000
TNF-RI (pg/ml)	1420,35 (1082,3-1993,6)	1121,35 (859,7-1275,9)	0,115	1419 (1109,4-1637,5)	1112,4 (969,5-1263)	0,157
Endotelina-1 (pg/ml)	19,8 (18,1-22,2)	19,95 (19,3-22,3)	0,624	19,45 (16,3-20,5)	18,7 (18,3-19,8)	0,870
IL-18 (pg/ml)	627,65 (335,1-909,6)	523,9 (374,7-669,0)	0,745	244,3 (170,4-405,9)	149,7 (126,0-225,2)	0,103

TCPH, transplante de células progenitoras hematopoética; IIQ, intervalo interquartil

6 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou, pela primeira vez, que o TCPH alogênico aparentado HLA idêntico de irmão(ã) para tratamento da DF foi capaz de reduzir a ativação e a disfunção endotelial, após 24 meses do procedimento, nos pacientes que mantiveram o enxerto funcionante durante todo este período. Houve redução dos níveis séricos de marcadores relacionados à ativação endotelial (E-selectina, VCAM-1, endotelina-1), à coagulação (D-dímero) e à inflamação (IL-33, pentraxina-3, IL-18), 24 meses pós-TCPH, em relação ao período pré-transplante nesses pacientes.

Também foi demonstrado neste estudo que o TCPH alogênico, além de prevenir complicações agudas e crônicas relacionadas à DF, reduziu a ativação e a disfunção endotelial em pacientes que já haviam recebido tratamento com HU e/ou transfusão crônica. Todos os pacientes estavam em tratamento até o início do condicionamento do TCPH, exceto um, que teve o tratamento suspenso, pois apresentava contraindicação à HU, devido à presença de extensas úlceras em ambos os membros inferiores, e dificuldade de realização de transfusão crônica, devido à aloimunização contra antígenos eritrocitários.

Os resultados deste estudo foram obtidos em uma população composta por crianças e adultos, com mediana (variação) de idade de 14 (7-33) anos. Todos os pacientes apresentavam complicações da doença e 57,1% deles tinham indicação neurológica. A sobrevida global aos 24 meses pós-TCPH (95,2%) foi comparável aos dados da literatura, que estão entre 92 e 94% (BERNAUDIN *et al.*, 2007; GLUCKMAN *et al.*, 2017; WALTERS *et al.*, 2000). No grupo de pacientes que mantiveram o enxerto funcionante durante os primeiros 24 meses pós-TCPH, houve aumento dos níveis de Hb e redução dos níveis de bilirrubina indireta, de DHL e de HbS, confirmando o sucesso do tratamento.

Em relação à coagulação, os níveis séricos de D-dímero (MOHAN *et al.*, 2005; MOHAMEDY *et al.*, 2020) e de FvW-A2 (MOHAN *et al.*, 2005) estão aumentados em pacientes com DF, em comparação com controles saudáveis, e o envolvimento do sistema hemostático em crianças pode ser diferente do que ocorre nos adultos (LIPPI *et al.*, 2007). Um estudo encontrou níveis reduzidos de D-dímero em crianças com DF menores de 14 anos, em relação aos pacientes entre 14 e 24 anos (HARZIPANTELIS *et al.*, 2013). Um único estudo demonstrou a melhora da cinética da geração de trombina, mas não da capacidade total de sua produção, em crianças submetidas ao TCPH alogênico aparentado de irmão(ã) HLA idêntico para o

tratamento da DF (ROZEN *et al.*, 2019). No contexto do TCPH alogênico, também ocorre um aumento dos níveis séricos de FvW e de trombomodulina após o procedimento, que pode estar relacionado à enxertia neutrofílica, diante do aumento da produção de citocinas (SALAT *et al.*, 1997). Os níveis circulantes de trombomodulina são dependentes de outros fatores, como a presença de doença hepática, de disfunção renal, de infecção viral e de complicações relacionadas ao endotélio (WOYWODT *et al.*, 2004).

O presente estudo demonstrou que o marcador FvW-A2 teve níveis séricos maiores nos pacientes com menos de 16 anos no período pré-TCPH, em relação aos pacientes mais velhos, tanto no grupo estudo quanto no subgrupo de pacientes com enxerto funcionante. Apesar da ativação da coagulação estar associada à vasculopatia cerebral de pequenos vasos na DF (HYACINTH *et al.*, 2015), não houve diferença dos níveis séricos dos marcadores deste estudo entre os pacientes com e sem acometimento neurológico, antes e após 24 meses do TCPH. Nossos resultados também demonstraram um aumento dos níveis séricos de trombomodulina, 24 meses após o TCPH, em relação ao período pré-transplante, após redução significativa em relação ao sexto mês. Diante disto, acreditamos que avaliações subsequentes poderão demonstrar a redução progressiva até níveis semelhantes ou inferiores aos do período pré-TCPH ou a estabilização destes valores.

Em relação à DECH aguda, o marcador HGF apresenta níveis elevados no momento do seu diagnóstico no contexto do TCPH alogênico (FIEMMA et al, 2012), assim como nos pacientes com DF durante seu estado basal e durante a CVO, em relação aos controles saudáveis (QARI *et al.*, 2012). Após 24 meses do TCPH, houve redução dos níveis séricos de HGF, em relação ao período pré-transplante, nos pacientes com enxerto funcionante, independente da presença ou ausência de DECH aguda, o que sugere a redução da neovascularização secundária à doença. O marcador Reg3A é considerado um biomarcador de DECH aguda com envolvimento do trato gastrointestinal (FERRARA *et al.*, 2018) e é utilizado para a avaliação da resposta ao seu tratamento (LEVINE *et al.*, 2015). Este estudo demostrou níveis séricos elevados de Reg3A em pacientes com enxerto funcionante que desenvolveram DECH aguda, tanto no período pré-TCPH como 24 meses pós-transplante, em relação aos pacientes com enxerto funcionante que não desenvolveram esta complicação, confirmando a importância deste marcador no contexto da DECH aguda.

Este é o primeiro estudo que avaliou marcadores séricos relacionados à ativação e à disfunção endotelial no contexto da incompatibilidade ABO em TCPH alogênico para

tratamento da DF. A incompatibilidade ABO entre receptor e doador ocorre em aproximadamente 30% dos TCPHs alogênicos. Na incompatibilidade ABO maior pode ocorrer hemólise, aplasia da série vermelha e aumento da necessidade de transfusões de hemácias após o transplante (DE SANTIS *et al.*, 2018). A incompatibilidade ABO menor e bidirecional pode estar associada à DECH aguda, já que o endotélio, envolvido na fisiopatologia desta complicação, também expressa antígenos do sistema ABO (MUELLER *et al.*, 2011).

A substituição fisiológica ou após lesão das células endoteliais vasculares por células progenitoras derivadas da medula óssea do doador, após o TCPH, é um evento raro. Um estudo demonstrou, em biópsia de pele de 25 pacientes com incompatibilidade ABO menor, que apenas 2 destes pacientes apresentaram células endoteliais de origem do doador. Também não foram evidenciadas células endoteliais do doador em tecidos de diferentes órgãos (pele, coração, fígado e medula óssea), em necrópsias de cinco pacientes submetidos ao TCPH alogênico com incompatibilidade ABO (MUELLER *et al.*, 2011). Este estudo demonstrou que a incompatibilidade ABO menor e bidirecional potencializa a inflamação, a ativação do endotélio e a ativação da coagulação nos pacientes com enxerto funcionante, 24 meses após o TCPH, pois foi observado um aumento dos níveis séricos de IL-6, P-selectina e D-dímero, em relação aos pacientes com enxerto funcionante e com incompatibilidade ABO maior ou isogrupos com seus respectivos doadores.

O aumento dos níveis séricos de IL-6 e P-selectina no grupo de pacientes com incompatibilidade ABO menor e bidirecional pode estar relacionado à ausência de diferença dos níveis séricos destes marcadores antes e após 24 meses do transplante no grupo de pacientes com enxerto funcionante. Estudos demonstram que estes marcadores têm níveis elevados em pacientes com DF, em relação aos controles saudáveis (CONRAN *et al.*, 2004; HYACINTH *et al.*, 2015; QARI *et al.*, 2012; ZAHRAN *et al.*, 2020), sendo esperada a redução dos seus níveis séricos com o tratamento da doença, o que não foi observado neste estudo.

Nossos resultados também sugerem a associação da incompatibilidade ABO menor e bidirecional com a DECH aguda, devido ao aumento dos níveis séricos de HGF nos pacientes com enxerto funcionante e com estas incompatibilidades, 24 meses pós-TCPH, em relação aos pacientes com enxerto funcionante e com incompatibilidade ABO maior ou isogrupos com seus respectivos doadores. Esta relação foi sugerida previamente por um estudo do nosso grupo (DE SANTIS *et al.*, 2018).

O subgrupo dos pacientes que tiveram falha de enxertia secundária e voltaram a apresentar sinais e/ou sintomas da DF apresentou níveis séricos elevados de TNF-α, pentraxina-3, D-dímero, E-selectina, IL-33 e CD163, 24 meses pós-TCPH, em relação aos pacientes com enxerto funcionante, não apresentando diferenças na avaliação pré-transplante, o que reforça o impacto positivo do TCPH na função endotelial. Devido ao pequeno número de pacientes neste subgrupo, não foi possível avaliar as alterações dos níveis séricos dos marcadores, em relação aos períodos pré e pós-TCPH.

Este estudo apresenta limitações, sendo a principal delas o pequeno número de pacientes incluídos. Sabemos que esta é uma dificuldade frequente quando se trata de TCPH para tratamento da DF, uma terapia recente que teve sua aprovação pelo SUS, no Brasil, há menos de 10 anos e que, mesmo com esta aprovação, encontra dificuldades para a sua ampla realização, como a falta de um doador irmão(ã) HLA idêntico. Além disso, não foram incluídos controles saudáveis neste estudo, já que os próprios pacientes, antes do TCPH, foram seus respectivos controles. Estudos futuros poderão avaliar se os níveis séricos dos marcadores que estão reduzidos após 24 meses do transplante são comparáveis ou não aos da população saudável.

Diante destes resultados, existem perspectivas de futuros projetos, incluindo a análise de marcadores no momento do diagnóstico da falha de enxertia e da DECH aguda, que poderão auxiliar no diagnóstico precoce ou até mesmo no tratamento preemptivo destas complicações. O impacto de diferentes intensidades de condicionamento na ativação e na disfunção endotelial, assim como a avaliação de marcadores séricos em TCPH com doadores alternativos também poderão ser avaliados em estudos futuros.

Entendemos que a cura da DF pelo TCPH alogênico não consiste apenas na substituição da população eritrocitária defeituosa por uma outra sem alterações. Os ganhos em sobrevida global e em sobrevida livre de doença podem ou não estar ligados às complicações endoteliais a longo prazo, que, só com o tempo e através de pesquisas como esta, poderão ser identificadas e resolvidas.

7 CONCLUSÃO

Este estudo, que avaliou pacientes submetidos a TCPH alogênico aparentado HLA idêntico de irmão(ã) com condicionamento mieloablativo e medula óssea como fonte de CPH para tratamento da DF, demonstrou que:

a) a sobrevida global 24 meses pós-TCPH dos pacientes do estudo foi comparável aos dados da literatura;
b) os pacientes que mantiveram o enxerto funcionante durante os primeiros 24 meses pós-TCPH tiveram melhora dos marcadores séricos relacionados à DF (hemoglobina, bilirrubina, DHL e HbS), confirmando o sucesso do tratamento;
c) o TCPH foi capaz de reduzir a ativação endotelial, caracterizada pela redução dos níveis séricos de E-selectina, VCAM-1 e endotelina-1; de reduzir inflamação, com a redução dos níveis séricos de IL-33, IL-18 e pentraxina-3; e de reduzir a ativação da coagulação, através da redução dos níveis séricos de D-dímero, 24 meses após o procedimento, nos pacientes com enxerto funcionante;
d) a incompatibilidade ABO menor e bidirecional potencializou a inflamação, a ativação do endotélio e a ativação da coagulação nos pacientes com enxerto funcionante, 24 meses após o TCPH, em relação aos pacientes com enxerto funcionante e com incompatibilidade ABO maior ou isogrupos com seus respectivos doadores;
e) os pacientes com falha de enxertia secundária apresentaram níveis séricos maiores de marcadores relacionados à ativação e à disfunção endotelial, 24 meses pós-TCPH, em relação aos pacientes que mantiveram o enxerto funcionante.

Embora os pacientes deste estudo já apresentassem lesão endotelial secundária à DF, a lesão adicional ocasionada pelo TCPH não causou impacto negativo na função endotelial 24 meses pós-transplante, demonstrando que esta modalidade de tratamento é segura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[1]

ABBOUD, M. R., *et al.* Discontinuing prophylactic transfusions increases the risk of silent brain infarction in children with sickle cell disease: data from STOP II. **Blood**, v.118, n.4, p.894-898, July 2011.

ABRAHAM, A. *et al.* Relationship between Mixed Donor-Recipient Chimerism and Disease Recurrence after Hematopoietic Cell Transplantation for Sickle Cell Disease. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.23, n.12, p.2178-2183, Dec. 2017.

AIRD, W. C. *et al.* Endothelium as a Therapeutic Target in Sepsis. **Curr Drug Targets**, v.8, n.4, p.501-507, Apr. 2007.

ALAGBE, A. E.; OLANYIY, J. A.; AWORANTI, O. W. Adult Sickle Cell Anaemia Patients in Bone Pain Crisis have Elevated Pro-Inflammatory Cytokines. **Mediterr J Hematol Infect Dis**, v.10, n.1, e2018017, Mar. 2018.

ANGELUCCI, E. A. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia major and sickle cell disease: indications and management recommendations from an international expert panel. **Haematologica,** v.99, n.5, p.811-820, May 2014.

ANTIN, J. H. *et al.* Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.7, n.9, p.473-485, 2001.

ANYONA, S.B. et al. Functional Promoter Haplotypes of Interleukin-18 Condition Susceptibility to Severe Malarial Anemia and Childhood Mortality. **Infect Immun,** v.79, n.12, p.4923-4932, Oct. 2011.

ATAGA, K. I. *et al.* Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. **N Engl J Med,** v.376, n.5, p.429-439, Feb. 2017

ATAGA, K. I.; KEY, N. S. Hypercoagulability in Sickle Cell Disease: New Approaches to an Old Problem. **Hematology Am Soc Hmatol Educ Program,** v.1, p.91-96, Jan. 2007.

[1] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

ASARE, K. *et al.* Plasma interleukin-1beta concentration is associated with stroke in sickle cell disease. **Cytokine,** v.49, n.1, p.39-44, Jan. 2010.

BANDEIRA, I. C. J. *et al.* Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB*S haplotype. **Cytokine,** v.65, n.2, p.217-221, Feb.2014.

BARON, F; BEGUIN, Y. Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte infusions after allogeneic HPC transplantation. **Transfusion**, v.40, n.4, p.468-476, Apr. 2000.

BATTERSBY, A. J.; KNOX-MACAULAY, H. H.; CARROL, E. D. Susceptibility to invasive bacterial infections in children with sickle cell disease. **Pediatr Blood Cancer**, v.55, n.3, p.401-406, Sept. 2010.

BHATIA, M. *et al.* Health-Related Quality of Life after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Sickle Cell Disease. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.21, n.4, p.666-672, Jan. 2015.

BHATIA, M. *et al.* Reduced toxicity, myeloablative conditioning with BU, fludarabine, alemtuzumab and SCT from sibling donors in children with sickle cell disease. **Bone Marrow Transplant**, v.49, n.7, p.913-920, July 2014.

BELCHER, J. D. *et al.* Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease 2014. **Blood**, v.123, n.3, p.377-390, Jan. 2014.

BENKERROU, M. *et al.* Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H(2)O(2) production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. **Blood,** v.99, n.7, p.2297-2303, Apr. 2002.

BENNEWITZ, M. F. *et al.* Lung vaso-occlusion in sickle cell disease mediated by arteriolar neutrophil-platelet microemboli. **JCI Insight,** v.2, n.1, e89761, Jan. 2017.

BERNAUDIN. F. *et al.* Long-term event-free survival, chimerism and fertility outcomes in 234 patients with sickle-cell anemia younger than 30 years after myeloablative conditioning and matched-sibling transplantation in France. **Haematologica,** v.105, n.1, p.91-101, Jan. 2020.

BERNAUDIN, F. *et al.* Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. **Blood**, v.110, n.7, p.2749-2756, Oct. 2007.

BLANN, A. D. *et al.* Soluble P-selectin and vascular endothelial growth factor in steady state sickle cell disease: relationship to genotype. **J Thromb Thrombolysis**, v.25, n.2, p.185-189, Apr. 2008.

BRACHET, C. *et al.* Hydroxyurea treatment for sickle cell disease: impact on haematopoietic stem cell transplantation's outcome. **Bone Marrow Transplant**, v.33, n.8, p.799-803, Apr. 2004.

BRANDOW, A. M. *et al.* American Society of Hematology 2020 guidelines for sickle cell disease: management of acute and chronic pain. **Blood Advances**, v.4, n.12, p.2656-2701, June 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Do Capítulo VI da seção I da Portaria de Consolidação nº 05/GM/MS, de 28 de setembro de 2017, publicada no Diário Oficial da União nº 190, de 03 de outubro de 2017, página 360, seção Suplemento DOU. Disponível em: http://portal.in.gov.br/.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Portaria nº1321, de 21 de dezembro de 2015. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2015/prt1321_21_12_2015.

CAMPBELL, M. J. **Medical statistics: a textbook for the health sciences.** 4th ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007. 346p.

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Rev bras hematol hemoter**, v.29, n.3, p.203-206, 2007.

CAPPELLI, A. *et al.* Risk factors and outcomes according to age at transplantation with an HLA-identical sibling for sickle cell disease. **Haematologica**, v.104, n.12, e543-e546, Dec. 2019.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. *et al.* Clinical and genetic ancestry profile of a large multi-centre sickle cell disease cohort in Brazil. **Br J Haematol,** v.182, n.6, p.895-908, Sept. 2018.

CARRERAS, E.; DIAZ-RICART, M. The role of the endothelium in the short-term complications of hematopoietic SCT. **Bone Marrow Transplant,** v.46, n.12, p.1495-1502, Dec. 2011.

CERQUEIRA, B. A. V. *et al*. Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: Contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. **Cytokine,** v.56, n.2, p.471-476, Nov. 2011.

CHOI, S. W. *et al.* Change in plasma tumor necrosis factor receptor 1 levels in the first week after myeloablative allogeneic transplantation correlates with severity and incidence of GVHD and survival. **Blood**, v.112, n.4, p.1539-1542, Aug. 2008.

CHOU, S. T., FASANO, R. M. Management of Patients with Sickle Cell Disease Using Transfusion Therapy: Guidelines and Complications. **Hematol Oncol Clin North Am**, v.30, n.3, p.591-608, June 2016.

CINES, D. B. *et al.* Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. **Blood**, v.91, n.10, p.3527-3561, May 1998.

COLELLA, M. P. *et al.* Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia. **J Thromb Haemost**, v.10, n.9, p.1967-1970, Sept. 2012.

COLEMAN, S. *et al.* Alloimmunization in patients with sickle cell disease and underrecognition of accompanying delayed hemolytic transfusion reactions. **Transfusion,** v.59, n.7, p.2282-2291, July 2019.

CONOVER, W. J. **Practical Nonparametric Statistics.** 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1998. 608p.

CONRAN, N.; DE PAULA, E. Thromboinflammatory mechanisms in sickle cell disease – challenging the hemostatic balance. **Haematologica,** v.105, n.8, p.1-11, Oct. 2020.

CONRAN, N. *et al.* Increased Levels of Soluble ICAM-1 in the Plasma of Sickle Cell Patients Are Reversed by Hydroxyurea. **Am J Hematol,** v.76, n.4, p.343-347, Aug. 2004.

CORDES, S. *et al.* Endothelial damage and dysfunction in acute graft-versus-host disease. **Haematologica**, *Ahead of Print* on July 16, 2020. DOI:10.3324/haematol.2020.253716.

COSTA, T. C. M. *et al.* Capilaroscopia periungueal em pacientes com doença falciforme submetidos a transplante de células progenitoras hematopoéticas. *In:* XXIII CONGRESSO SBTMO 2019. **Anais** [...]. Brasília-DF, 2019, p.76. Disponível em: https://sbtmo.org.br/ userfiles/anais/98d81eb184c86394fd9109bbffd2e702.pdf

COSTA, T. C. M. *et al.* HSCT for hemoglobinopathies. **JBMTCT,** v.2, n.1, p.44-53, Mar. 2021

DALLAS, M. H. *et al.* Long-Term Outcome and Evaluation of Organ Function in Pediatric Patients Undergoing Haploidentical and Matched Related Hematopoietic Cell Transplantation for Sickle Cell Disease. **Biol Blood Marrow Tranplant,** v.19, n.5, p.820-830, May 2013.

DAR, J. *et al.* Raised D-dimer levels in acute sickle cell crisis and their correlation with chest X-ray abnormalities. **Ger Med Sci**, v.8, doc.25, Oct. 2010.

DEDEKEN, L. *et al.* Haematopoietic stem cell transplantation for severe sickle cell disease in childhood: a single centre experience of 50 patients. **Br J Haematol**, v.165, n.3, p.402-408, May 2014.

DE SANTIS, G. C. *et al.* Blood transfusion support for sickle cell patients during haematopoietic stem cell transplantation: a single-institution experience. **Br J Haematol,** v.190, n.5, e295-e297, Sept. 2020.

DE SANTIS, G. C. *et al.* Higher Anti-A/B isoagglutinin titers of IgG class, but not of IgM, are associated with increased red blood cell transfusion requirements in bone marrow transplantation with major ABO-mismatch. **Clin Transplant,** v.31, n.4, e12913, Apr. 2017.

DE SANTIS, G. C. *et al.* Impact of ABO-mismatch on outcome in bone marrow transplantation. **ISBT Science Series**, v.13, p.158-164, Sept. 2018.

DWORKIS, D. A. *et al.* Severe sickle cell anemia is associated with increased plasma levels of TNF-R1 and VCAM-1. **Am J Hematol**, v.86, n.2, p.220-223, Feb. 2011.

ELSHAZLY, S. A. *et al.* Plasma PTX3 levels in sickle cell disease patients, during vaso occlusion and acute chest syndrome (data from Saudi population). **Hematology,** v.19, n.1, p.52-59, Jan. 2014.

FERRARA, J. L. M. *et al.* GVHD: biology matters. **Blood Adv**, v.2, n.22, p.3411-3417, Nov. 2018.

FIEMMA, B. *et al.* High throughput sequential ELISA for validation of biomarkers of acute graft-versus-host disease. **J Vis Exp,** v.31, n.68, e4247, Oct. 2012.

FITZHUGH, C. D. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation for patients with sickle cell disease: progress and future directions. **Hematol Oncol Clin North Am**, v.28, n.6, p.1171-1185, Dec. 2014.

FLOR-PARK, M. V. *et al.* Identification and Characterization of Hematopoietic Stem Cell Transplant Candidates in a Sickle Cell Disease Cohort. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.25, n.10, p.2103-2109, Oct. 2019.

FLOWERS, M. E.; MARTIN, P. J. How we treat chronic graft-versus-host disease. **Blood**, v.125, n.4, p.606-615, Jan. 2015.

FOX, B. M.; KASZTAN, M. Endothelin receptor antagonists in sickle cell disease: A promising new therapeutic approach. **Life sciences,** v.159, p.15-19, Aug. 2016.

FUKSIEWICZ, M. *et al.* Serum soluble tumour necrosis factor receptor type I concentrations independently predict prognosis in patients with breast cancer. **Clin Chem Lab Med**, v.48, n.10, p.1481-1486, Oct. 2010.

FUKUSHIMA, T. *et al.* Hepatocyte Growth Factor Activator: A Proteinase Linking Tissue Injury with Repair. **Int J Mol Sci,** v.19, n.11, e3435, Nov. 2018.

GAVINS, F. N. *et al.* Mechanisms of enhanced thrombus formation in cerebral microvessels of mice expressing hemoglobin-S. **Blood**, v.117, n.15, p.4125-4133, Apr. 2011.

GLADWIN, M. T.; VICHINSKY, E. Pulmonary complications of sickle cell disease. **N Engl J Med**, v.359, n.21, p.2254-2265, Nov. 2008.

GLEITZ, H. F. E. *et al.* Increased CXCL4 expression in hematopoietic cells links inflammation and progression of bone marrow fibrosis in MPN. **Blood**, v.136, n.18, p.2051-2064, Oct. 2020.

GLUCKMAN, E. *et al.* Sickle cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. **Blood,** v.129, n.11, p.1548-1556, Mar. 2017.

GLUCKMAN, E. *et al.* The role of HLA matching in unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease in Europe. **Bone Marrow Transplant**, v.55, n.10, p.1946-1954, Oct. 2020.

GRECO, R. *et al.* Interleukin-6 as Biomarker for Acute GvHD and Survival After Allogeneic Transplant With Post-transplant Cyclophosphamide. **Front Immunol**, v.10:2319, Oct. 2019.

GUPTA, A. *et al.* IL-18 mediates sickle cell cardiomyopathy and ventricular arrhythmias. **Blood,** v.137, n.9, p.1208-1218, Mar. 2021.

HARZIPANTELIS, E. S. *et al.* Endothelial activation and inflammation biomarkers in children and adolescents with sickle cell disease. **Int J Hematol**, v.98, n.2, p.158-163, Aug. 2013.

HUBBARD, A. K.; ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. **Free Radic Biol Med**, v.28, n.9, p.1379-1386, May 2000.

HYACINTH, H. I. *et al.* Effect of Chronic Blood Transfusion on Biomarkers of Coagulation Activation and Thrombin Generation in Sickle Cell Patients at Risk for Stroke. **PLoS One,** v.10, n.8, e0134193, Aug. 2015.

JAGASIA M. H. *et al*. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.21, n.3, p.389-401.e1., Mar. 2015.

JOHNSON, F.L. *et al.* Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia. **N Engl J Med**, v.311, n.12, p.780-783, Sept. 1984.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Rev**, v.21, n.1, p.37-47, Jan. 2007.

KATO, G. J. Sickle cell vasculopathy: vascular phenotype on fire! **J Physiol**, v.597, n.4, p.993-994, Feb. 2019.

KAUL, D. K.; FABRY, M. E.; NAGEL, R. L. Microvascular sites and characteristics of sickle cell adhesion to vascular endothelium in shear flow conditions: pathophysiological implications. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v.86, n.9, p.3356-3360, May 1989.

KELLY, S. *et al.* Blood utilization and characteristics of patients treated with chronic transfusion therapy in a large cohort of Brazilian patients with sickle cell disease. **Transfusion,** v.60, n.8 p.1713-1722, Aug. 2020.

KUROIWA, T. *et al.* Hepatocyte growth factor ameliorates acute graft-versus-host disease and promotes hematopoietic function. **J Clin Invest**, v.107, n.11, p.1365-1373, June 2001.

LANZKRON, S. *et al.* Systematic review: Hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease**. Ann Intern Med**, v.148, n.12, p.939-955, June 2008.

LAU, S. K.; CHU, P. G.; WEISS, L. M. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. **Am J Clin Pathol**, v.122, n.5, p.794-802, Nov. 2004.

LEE, S. J. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. **Blood**, v.129, n.1, p.30-37, Jan. 2017.

LEVINE, J. E. *et al.* A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicentre study. **Lancet Haematol**, v.2, n.1, e21-29, Jan. 2015.

LIEW, F. Y.; GIRARD, J. P.; TURNQUIST, H. R. Interleukin-33 in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v.16, n.11, p.676-689, Nov. 2016.

LIPPI, G. *et al.* Coagulation Testing in Pediatric Patients: The Young Are Not Just Miniature Adults. **Semin Thromb Hemost 2007**, v.33, n. 8, p.816-820, 2007.

LJUNGMAN, P.; HAKKI, M.; BOECKH, M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Infect Dis Clin North Am**, v.24, n.2, p.319-337, June 2010.

LOBO, C. L. C. *et al.* Mortality in children, adolescents and adults with sickle cell anemia in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.40, n.1, p.37-42, Jan./Mar. 2018.

LOPES, F. C. *et al.* In vitro and in vivo anti-angiogenic effects of hydroxyurea. **Microvasc Res**, v.94, p.106-113, July 2014.

MAHESHWARI, S. *et al.* Targeted Busulfan therapy with a steady-state concentration of 600-700 ng/mL in patients with sickle cell disease receiving HLA-identical sibling bone marrow transplant. **Bone Marrow Transplant**, v.49, n.3, p.366-369, Mar. 2014.

MAJOR-MONFRIED, H. *et al.* MAGIC biomarkers predict long-term outcomes for steroid-resistant acute GVHD. **Blood**, v.131, n.25, p.2846-2855, June 2018.

MARTIN, P. J. *et al.* First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.18, n.8, p.1150-1163, Aug. 2012.

MENDES, L. S. C. *et al.* Transplante hepático após transplante de células progenitoras hematopoiéticas em doença falciforme. **Revista Eletrônica Acervo Saúde,** v.13, n.1, e5336, Jan. 2021.

MERTLITZ, S. *et al.* Lymphangiogenesis is a feature of acute GVHD, and VEGFR-3 inhibition protects against experimental GVHD. **Blood**, v.129, n.13, p.1865-1875, Mar. 2017.

MOHAMED, E. A. *et al.* Comparative study of hypercoagulability change in steady state and during vaso-occlusive crisis among Sudanese patients living with sickle cell disease. **Afr Health Sci,** v.20, n.1, p.392-396, Mar. 2020.

MOHAN, J. S. *et al.* Plasma levels of tissue factor and soluble E-selectin in sickle cell disease: relationship to genotype and to inflammation. **Blood Coagul and Fibrinolysis**, v.16, n.3, p.209-214, Apr. 2005.

MOLLER, H. J. *et al.* Soluble CD163 levels in children with sickle cell disease. **Br J Haematol**, v.153, n.1, p.105-110, Apr. 2011.

MOSSALLAM, G. I. *et al.* Prognostic utility of routine chimerism testing at 2 to 6 months after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.15, n.3, p.352-359, Mar. 2009.

MUELLER, R. J. *et al.* Persistence of recipient-type endothelium after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Haematologica,** v.96, n.1, p.119-127, Jan. 2011.

NADER, E.; ROMANA, M.; CONNES, P. The Red Blood Cell-Inflammation Vicious Circle in Sickle Cell Disease. **Front Immunol**, v.11, article 454, Mar. 2020.

NUR, E. *et al.* Plasma levels of pentraxin-3, an acute phase protein, are increased during sickle cell painful crisis. **Blood,** v.46, n.3, p.189-194, Mar. 2011.

OSUNKWO, I.; MANWANI, D.; KANTER, J. Current and novel therapies for the prevention of vaso-occlusive crisis in sickle cell disease. **Ther Adv Hematol**, v.11:2040620720955000, Sept. 2020.

PANEPINTO, J. A. *et al.* Matched-related donor transplantation for sickle cell disease: report from the Center for International Blood and Transplant Research. **Br J Haematol**, v.137, n.5, p.479-485, June 2007.

PIEL, F. B. *et al.* Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. **Lancet,** v.381, n.9861, p.142-151, Jan. 2013.

PIEL, F. B.; Steinberg, M. H.; Rees, D. C. Sickle Cell Disease. **N Engl J Med**, v.376, n.16, p.1561-1573, Apr. 2017.

PLATT, O. S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. **N Engl J Med**, v.358, n.13, p.1362-1369, Mar. 2008.

PLATT, O. S. The acute chest syndrome of sickle cell disease. **N Engl J Med**, v.342, n.25, p.1904-1907, Jun. 2000.

PORTER, J.; GARBOWSKI, M. Consequences and management of iron overload in sickle cell disease. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p.447-456, 2013.

QARI, M. H. *et al.* Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. **Clin Appl Thromb Hemost**, v.18, n.2, p.195-200, Mar./Apr. 2012.

RESS, D. C. *et al.* How I manage red cell transfusions in patients with sickle cell disease. **Br J Haematol,** v.180, n.4, p.607-617, Feb. 2018.

RICARD, N. *et al.* The quiescent endothelium: signalling pathways regulating organ-specific endothelial normalcy. **Nat Rev Cardiol**, v.24, n.1, p.1-16, Feb. 2021.

RIUL, S.; AGUILLAR, O.M. Contribuição à organização de serviços de transplante de medula óssea e a atuação do enfermeiro. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v.5, n.1, p.49-57, 1997.

ROZEN, L. *et al.* Is There Any Improvement of the Coagulation Imbalance in Sickle Cell Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation? **J Clin Med,** v.8, n.11, p.1796, Oct. 2019.

SALAT, C. *et al.* Endothelial cell markers in bone marrow transplant recipients with and without acute graft-versus-host disease. **Bone Marrow Transplant,** v.19, n.9, p.909-914, May 1997.

SALEH, A. W.; HILLEND, H. F. P.; DUITS, A. J. Levels of endothelial, neutrophil and platelet-specific factors in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. **Acta Haematol,** v.102, n.1, p.31-37, 1999.

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v.112, n.10, p.3927-3938, Nov. 2008.

SCHOEMANS, H. M. *et al.* EBMT-NIH-CIBMTR Task Force position statement on standardized terminology & guidance for graft-versus-host disease assessment. **Bone Marrow Transplant**, v.53, n.11, p.1401-1415, Nov. 2018.

SEEBACH, J. D. *et al.* ABO blood group barrier in allogeneic bone marrow transplantation revisited. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.11, n.12, p.1006-1013, Dec. 2005.

SHENOY, S. *et al.* Current Results and Future Research Priorities in Late Effects after Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Children with Sickle Cell Disease and Thalassemia: A Consensus Statement from the Second Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium International Conference on Late Effects after Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant,** v.23, n.4, p.552-561, Apr. 2017.

SHENOY, S. *et al.* Late Effects Screening Guidelines after Hematopoietic Cell Transplantation (HCT) for Hemoglobinopathy: Consensus Statement from the Second Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium International Conference on Late Effects after Pediatric HCT. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.24, n.7, p.1313-1321, July 2018.

SIEGEL, S.; CASTELLAN JR, N. J. **Estatística Não Paramétrica para Ciências do Comportamento.** Bookman, 2. ed. São Paulo, 2006. 448p.

SONI, S. *et al.* Outcomes of matched sibling donor hematopoietic stem cell transplantation for severe sickle cell disease with myeloablative conditioning and intermediate-dose of rabbit anti-thymocyte globulin. **Pediatr Blood Cancer**, v.61, n.9, p.1685-1689, Sept. 2014.

STEYERS, C. M.; MILLER, F. J. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases**. Int J Mol Sci**, v.15, n.7, p.11324-11349, June 2014.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annu Rev Pathol**, v.14, p.263-292, Jan. 2019.

SUNG, A. D.; CHAO, N. J. Concise review: acute graft-versus-host disease: immunobiology, prevention, and treatment. **Stem Cells Transl Med**, v.2, n.1, p.25-32, Jan. 2013.

SUREDA, A. *et al.* Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2015. **Bone Marrow Transplant**, v.50, n.8, p.1037-1056, Aug. 2015.

SZMITKO, P. E. *et al.* New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. **Circulation**, v.108, n.16, p.1917-1923, Oct. 2003.

TELEN, M. J. Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease. **Blood**, v.127, n.7, p.810-819, Feb. 2016.

TELEN, M. J. *et al.* Alloimmunization in sickle cell disease: changing antibody specificities and association with chronic pain and decreased survival. **Transfusion**, v.55, n.6 Pt.2, p.1378-1387, June 2015.

TICHELLI, A. *et al.* Premature cardiovascular disease after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. **Blood,** v.110, n.9, p.3463-3471, July 2007.

TOMER, A. *et al.* Thrombogenesis in sickle cell disease. **J Lab Clin Med**, v.137, n.6, p.398-407, June 2001.

VERMYLEN, C. *et al.* Haematopoietic stem cell transplantation for sickle cell anaemia: the first 50 patients transplanted in Belgium. **Bone Marrow Transplant**, v.22, n.1, p.1-6, July 1998.

VICARI, P.; BARRETTO DE MELLO, A.; FIGUEIREDO, M. S. Effects of hydroxyurea in a population of Brazilian patients with sickle cell anemia. **Am J Hematol**, v.78, n.3, p.243-244, Mar. 2005.

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,** v.95, n.6, p.1918-1924, Mar. 2000.

WALTERS, M. C. *et al.* Indications and Results of HLA-Identical Sibling Hematopoietic Cell Transplantation for Sickle Cell Disease. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.22, n.2, p.207-211, Feb. 2016.

WALTERS, M. C. *et al.* Multicenter Investigation of Bone Marrow Transplantation for Sickle Cell Disease. Stable mixed hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation for sickle cell anemia. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.7, n.12, p.665-673, Dec. 2001.

WARE, R. E.; HELMS, R. W. Stroke With Transfusions Changing to Hydroxyurea (SWiTCH). **Blood,** v.119, n.17, p.3925-3932, Apr.2012.

WEY, J. *et al.* Red Blood Cells Store and Release Interleukin-33. **J Investig Med**, v.63, n.6, p.806-810, Aug. 2015.

WOOD, K. C.; GRANGER, D. N. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites**. Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.34, n.9, p.926-932, Sept. 2007.

WOYWODT, A. *et al.* Counting the cost: markers of endothelial damage in hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant,** v.34, n.12, p.1015-1023, Dec. 2004.

YAZDANBAKHSH, K.; WARE, R. E.; NOIZAT-PIRENNE, F. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. **Blood**, v.120, n.3, p.528-537, July 2012.

ZAGO, M.; Pinto, A. C. S. The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan disfunction. **Rev bras hematol hemoter**, v.29, n.3, p.207-214, 2007.

ZAHRAN, A. M. *et al.* Effect of Hydroxyurea Treatment on the Inflammatory Markers Among Children with Sickle Cell Disease. **Clin Appl Thromb Hemost,** v.26, p.1-7, Jan./Dec. 2020.

ZHANG, D. *et al.* Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood**, v.127, n.7, p.801-809, Feb. 2016.

ZHENG, Y; CHOU, S. T. Transfusion and Cellular Therapy in Pediatric Sickle Cell Disease. **Clin Lab Med,** v.41, n.1, p.101-119, Mar. 2021.

ZHOU, Z.; BEHYMER, M.; GUCHHAIT, P. Role of extracellular hemoglobin in thrombosis and vascular occlusion in patients with sickle cell anemia. **Anemia**, v.2011:918916, 2011.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FMRP-USP RIBEIRÃO PRETO

Ribeirão Preto, 10 de junho de 2015

Ofício nº 2090/2015
CEP/MGV

Prezada Senhora,

O trabalho intitulado **"TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA EM ANEMIA FALCIFORME: IMPACTO DO PROCEDIMENTO SOBRE MARCADORES DA DOENÇA E QUALIDADE DE VIDA" – Versão 1.1, de 25/05/2015,** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 409ª Reunião Ordinária realizada em 08/06/2015 e enquadrado na categoria: **APROVADO,** bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – versão 1.1, de 25/05/2015 e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido, de 25/05/2015,** de acordo com o Processo HCRP nº 2479/2015.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
PROFª.DRª. BELINDA PINTO SIMÕES
Depto. de Clínica Médica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP
Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440
(16)3602-2228/cep@hcrp.usp.br
www.hcrp.usp.br

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido para adultos

CENTRO DE TERAPIA CELULAR - CENTRO REGIONAL DE HEMOTERAPIA DE RIBEIRÃO PRETO DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS - FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

"Transplante de Medula Óssea em anemia falciforme: impacto do procedimento sobre marcadores da doença e qualidade de vida".

Pesquisadores responsáveis:

Júlia Teixeira Cottas de Azevedo/ Ana Carolina Freitas Silveira Sobral Paixão / Dra. Kelen Cristina Ribeirão Malmegrim de Farias/ Dra. Belinda Pinto Simões

Prezado voluntário,

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida pelo corpo clínico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP-RP em conjunto com os pesquisadores do Centro de Terapia Celular - Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP, com o objetivo de conhecer melhor os mecanismos imunológicos, hematológicos e inflamatórios envolvidos na resposta terapêutica de pacientes com anemia falciforme tratados o transplante de células-tronco hematopoéticas. A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento.

Porque esta pesquisa está sendo feita?

A anemia falciforme (AF) é uma doença inflamatória crônica relativamente frequente na população brasileira. Atualmente, ela é tratada pelo uso de hidroxiureia e por transfusões sanguíneas, contudo essas formas de tratamento possuem limitações e nem todos pacientes com AF respondem a elas. A única opção curativa para esses pacientes é o transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico (TCTH), entretanto o estudo de pacientes com AF transplantados é muito pequeno e os mecanismos de reconstituição imuno-hematológica após o transplante não são completamente entendidos. Portanto, o objetivo dessa pesquisa é analisar a resposta terapêutica de pacientes com anemia falciforme tratados com transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas, por meio da avaliação de marcadores inflamatórios, imunológicos e hematológicos, além de avaliar os mecanismos de reconstituição imuno-hematológica após o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas.

Como será feita esta pesquisa?

Como você tem indicação para transplante de medula óssea pela sua doença você será avaliado clinicamente com exames de sangue e radiografias para avaliarmos a sua situação clínica. Após ter concordado em participar do estudo e ter assinado este termo de consentimento você receberá os questionários de qualidade de vida a serem preenchidos. Estes questionários você deverá preencher novamente após o transplante de medula óssea (dia 60, 1 ano e depois de suspender a ciclosporina que pode demorar de 18 a 24 meses).

A coleta de sangue periférico será feita por punção de veia do braço, após assepsia do local, pela equipe de enfermagem do Hemocentro de Ribeirão Preto. A partir do sangue coletado, serão feitas análises a fresco (sangue total), serão isolados o soro e plasma e serão extraídos o DNA e RNA para as análises posteriores.

O que será feito com as células remanescentes a este estudo?

As células remanescentes a esta pesquisa serão conservadas no biorepositório de AMOSTRAS DE SANGUE E MEDULA ÓSSEA DA FMRP-USP2 para análises futuras, com finalidade científica, como você já concordou.

CENTRO DE TERAPIA CELULAR - CENTRO REGIONAL DE HEMOTERAPIA DE RIBEIRÃO PRETO DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS - FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Como você vai participar da pesquisa, quais são os riscos que podem ocorrer?

A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 89 mL de sangue. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. A coleta de sangue será realizada no braço, com seringas e agulhas descartáveis por um profissional capacitado, podendo levar a um leve desconforto passageiro. Além do desconforto da picada da agulha no momento da coleta de sangue, outros riscos que podem ocorrer são: formação de hematomas no local da punção venosa, dor e mais raramente, infecção no local da punção.

O que acontece se eu não aceitar em participar?

Caso não queira participar, o seu seguimento no ambulatório continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para o seu atendimento e tratamento.

Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?

Tendo em vista que as coletas todas serão realizadas nos retornos de rotina não haverá viagens ou despesas adicionais exclusivamente para o projeto. Assim não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. O único benefício será o de auxiliar-nos a tentar melhorar no futuro o tratamento de pessoas com anemia falciforme. Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento.

Garantimos o direito de receber respostas e esclarecimentos de quaisquer dúvidas a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa, bem como a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do seu atendimento ou tratamento.

Caso você se sinta prejudicado por esta pesquisa terá direito a indenização conforme as leis vigentes no país.

Você receberá uma via deste documento e terá caso deseje ao final da pesquisa acesso aos resultados obtidos com a pesquisa. Estamos à disposição para esclarecer qualquer dúvida sobre esta pesquisa. Neste caso, favor entrar em contato pelo telefone 3602-2609. Você poderá também contatar o comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto no telefone 016 36022228 para dúvidas éticas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento

Nome participante: _____Assinatura _____Data: ____/_____/_____

Nome pesquisador: _____Assinatura _____Data: ____/_____/_____

ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido para crianças

CENTRO DE TERAPIA CELULAR - CENTRO REGIONAL DE HEMOTERAPIA DE RIBEIRÃO PRETO DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS - FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

"Transplante de Medula Óssea em anemia falciforme: impacto do procedimento sobre marcadores da doença e qualidade de vida".

Pesquisadores responsáveis:

Júlia Teixeira Cottas de Azevedo/ Ana Carolina Freitas Silveira Sobral Paixão / Dra. Kelen Cristina Ribeirão Malmegrim de Farias/ Dra. Belinda Pinto Simões

Prezado voluntário,

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida pelo corpo clínico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP-RP em conjunto com os pesquisadores do Centro de Terapia Celular - Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP, com o objetivo de conhecer melhor os mecanismos imunológicos, hematológicos e inflamatórios envolvidos na resposta terapêutica de pacientes com anemia falciforme tratados o transplante de células-tronco hematopoéticas. A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento.

Porque esta pesquisa está sendo feita?

A anemia falciforme (AF) é uma doença inflamatória crônica relativamente frequente na população brasileira. Atualmente, ela é tratada pelo uso de hidroxiureia e por transfusões sanguíneas, contudo essas formas de tratamento possuem limitações e nem todos pacientes com AF respondem a elas. A única opção curativa para esses pacientes é o transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico (TCTH), entretanto o estudo de pacientes com AF transplantados é muito pequeno e os mecanismos de reconstituição imuno-hematológica após o transplante não são completamente entendidos. Portanto, o objetivo dessa pesquisa é analisar a resposta terapêutica de pacientes com anemia falciforme tratados com transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas, por meio da avaliação de marcadores inflamatórios, imunológicos e hematológicos, além de avaliar os mecanismos de reconstituição imuno-hematológica após o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas.

Como será feita esta pesquisa?

Como seu filho(a) tem indicação para transplante de medula óssea pela sua doença você será avaliado clinicamente com exames de sangue e radiografias para avaliarmos a sua situação clínica. Após ter concordado em participar do estudo e ter assinado este termo de consentimento ele receberá os questionários de qualidade de vida a serem preenchidos. Estes questionários ele deverá preencher novamente após o transplante de medula óssea (dia 60, 1 ano e depois de suspender a ciclosporina que pode demorar de 18 a 24 meses).

A coleta de sangue periférico será feita por punção de veia do braço, após assepsia do local, pela equipe de enfermagem do Hemocentro de Ribeirão Preto. A partir do sangue coletado, serão feitas análises a fresco (sangue total), serão isolados o soro e plasma e serão extraídos o DNA e RNA para as análises posteriores.

O que será feito com as células remanescentes a este estudo?

As células remanescentes a esta pesquisa serão conservadas no biorepositório de AMOSTRAS DE SANGUE E MEDULA ÓSSEA DA FMRP-USP2 para análises futuras, com finalidade científica, como você já concordou.

CENTRO DE TERAPIA CELULAR - CENTRO REGIONAL DE HEMOTERAPIA DE RIBEIRÃO PRETO DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS - FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Como você vai participar da pesquisa, quais são os riscos que podem ocorrer?

A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 89 mL de sangue. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. A coleta de sangue será realizada no braço, com seringas e agulhas descartáveis por um profissional capacitado, podendo levar a um leve desconforto passageiro. Além do desconforto da picada da agulha no momento da coleta de sangue, outros riscos que podem ocorrer são: formação de hematomas no local da punção venosa, dor e mais raramente, infecção no local da punção.

O que acontece se eu não aceitar em participar?

Caso não queira participar, o seu seguimento no ambulatório continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para o seu atendimento e tratamento.

Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?

Tendo em vista que as coletas todas serão realizadas nos retornos de rotina não haverá viagens ou despesas adicionais exclusivamente para o projeto. Assim não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. O único benefício será o de auxiliar-nos a tentar melhorar no futuro o tratamento de pessoas com anemia falciforme. Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento.

Garantimos o direito de receber respostas e esclarecimentos de quaisquer dúvidas a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa, bem como a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do seu atendimento ou tratamento.

Caso você se sinta prejudicado por esta pesquisa terá direito a indenização conforme as leis vigentes no país.

Você receberá uma via deste documento e terá caso deseje ao final da pesquisa acesso aos resultados obtidos com a pesquisa. Estamos à disposição para esclarecer qualquer dúvida sobre esta pesquisa. Neste caso, favor entrar em contato pelo telefone 3602-2609. Você poderá também contatar o comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto no telefone 016 36022228 para dúvidas éticas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento

Nome do menor:_____

Nome Responsável: _____Assinatura _____Data: ____/_____/_____

Nome pesquisador: _____Assinatura _____Data: ____/_____/_____

ANEXO D – Termo de assentimento

CENTRO DE TERAPIA CELULAR - CENTRO REGIONAL DE HEMOTERAPIA DE RIBEIRÃO PRETO DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS - FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE ASSENTIMENTO

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto:

"Transplante de Medula Óssea em anemia falciforme: impacto do procedimento sobre marcadores da doença e qualidade de vida".

Pesquisadores responsáveis:

Júlia Teixeira Cottas de Azevedo/ Ana Carolina Freitas Silveira Sobral Paixão / Dra. Kelen Cristina Ribeirão Malmegrim de Farias/ Dra. Belinda Pinto Simões

Você está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa pois você tem anemia falciforme. Para ficar curado desta doença você vai ser submetido a um transplante de medula óssea onde você receberá inicialmente quimioterapia e as células do seu doador. Depois haverá um tempo longo em que primeiro você fica um mês internado e depois fica sendo acompanhado de ambulatório. Para nós é importante saber se com este tratamento você se sentirá melhor ou pior de como se sente hoje. Assim você receberá um questionário sobre como estará se sentindo. Este questionário será feito antes do transplante e depois do transplante (2 meses depois, 1 ano depois e depois que for suspensa a ciclosporina). Estas informações serão muito importantes para nós, pois saberemos se o tratamento faz você se sentir melhor ou não. Os questionários são todos em papel, não faremos qualquer filmagem de você. O preenchimento dos questionários não dura mais de 20 minutos.

Sua participação é voluntária e caso você opte por não participar, não terá nenhum prejuízo ou represálias.

Contato para dúvidas:

Se você ou os responsáveis por você tiver(em) dúvidas com relação ao estudo, direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você deve contatar o(a) Investigador(a) do estudo ou membro de sua equipe: pelo telefone 016 36022609. Você poderá também contatar o comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto no telefone 016 36022228 para dúvidas éticas

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO SUJEITO DA PESQUISA:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

CENTRO DE TERAPIA CELULAR - CENTRO REGIONAL DE HEMOTERAPIA DE RIBEIRÃO PRETO DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS - FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento DE ASSENTIMENTO INFORMADO.

_____

NOME DO MENOR ASSINATURA DATA

_____

NOME DO INVESTIGADOR ASSINATURA DATA

ANEXO E – Classificação da doença do enxerto contra o hospedeiro aguda e crônica

Quadro 2 - Estadiamento e classificação global da DECH aguda (MAGIC).

Estadiamento	Pele	Fígado (bilirrubina total)	TGI alto	TGI baixo (diarreia)
0	Ausência de eritema	< 2,0 mg/dL	Náusea, vômito, anorexia ausente ou intermitente	Adulto: < 500 ml/dia ou < 3 episódios por dia Criança: < 10 ml/kg/dia ou < 4 episódios por dia
1	Eritema < 25% da SC	2,0 - 3,0 mg/dL	Náusea, vômito, anorexia persistente*	Adulto: 500 - 999 ml/dia ou 3 - 4 episódios por dia Criança: < 10,0 -19,9 ml/kg/dia ou 4 - 6 episódios por dia
2	Eritema entre 25-50% da SC	3,1 - 6,0 mg/dL		Adulto: 1.000 - 1.500 ml/dia ou 5 - 7 episódios por dia Criança: 20 – 30 ml/kg/dia ou 7 - 10 episódios por dia
3	Eritema > 50% da SC	6,1 - 15,0 mg/dL		Adulto: > 1.500 ml/dia ou > 7 episódios por dia Criança: > 30 ml/kg/dia ou > 10 episódios
4	Eritrodermia generalizada (> 50% da SC) com formação de bolhas e com descamação em > 5% da SC	> 15 mg/dL		Dor abdominal severa com ou sem íleo paralítico, ou com sangue (independente do volume de diarreia)

Classificação da gravidade global da DECH aguda

Grau	Critérios
I	Estadiamento I – II na pele, sem envolvimento de fígado e de TGI (alto e baixo)
II	Estadiamento III na pele e/ou estadiamento I no fígado e/ou estadiamento 1 no TGI (alto ou baixo)
III	Estadiamento II-III no fígado e/ou estadiamento II-III no TGI baixo, com estadiamento 0 – I na pele e/ou estadiamento 0 – 1 no TGI alto
IV	Estadiamento IV na pele, no fígado ou no TGI baixo, com estadiamento 0 – 1 no TGI alto

*A anorexia deve ser acompanhada de perda de peso, a náusea deve persistir por pelo menos 3 dias, ou estar acompanhada de pelo menos 2 episódios de vômito por dia, por pelo menos 2 dias.
DECH, doença do enxerto contra o hospedeiro; MAGIC, Consórcio Internacional de DECH aguda de Monte Sinai, do inglês *Moutn Sinai Acute Graft Versus Host* Disease; TGI, trato gastrointestinal; SC, superfície corporal. Fonte: adaptação de Schoemans *et al.* (2018).

Quadro 3 - Classificação da DECH crônica (NIH 2014).

(continua)

Órgão/Sistema	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
Pele	Ausência de lesões	1 - 18% da SC Lesões escleróticas superficiais	19 - 50% da SC	> 50% da SC Lesões escleróticas profundas, mobilidade alterada, úlceras
Boca	Sem sintomas	Sintomas leves, com sinais da doença, sem limitação significativa da ingesta oral	Sintomas moderados com sinais da doença e limitação parcial da ingesta oral	Sintomas graves, com sinais da doença e limitação importante da ingesta oral
Olho	Sem sintomas	Sintomas leves de olho seco não afetando as atividades diárias (uso de colírio ≤ 3 vezes por dia)	Sintomas moderados de olho seco afetando parcialmente as atividades diárias (uso de colírio > 3 vezes por dia ou uso de plug no canal lacrimal), sem prejuízo novo da visão devido à ceratoconjuntivite	Sintomas graves de olho seco afetando significativamente as atividades diárias ou incapacidade de trabalhar devido aos sintomas oculares ou perda da visão causada pela ceratoconjuntivite
Trato Gastrointestinal	Sem sintomas	Sintomas sem perda de peso significativa (< 5% em 3 meses)	Sintomas com perda de peso leve a moderada (5-15% em 3 meses) ou diarreia moderada sem interferência nas atividades diárias	Sintomas associados com perda de peso significativa (> 15% em 3 meses), necessidade de suplemento nutricional ou dilatação esofagiana ou diarreia grave com interferência nas atividades diárias
Fígado	Bilirrubina total normal e TGP ou FA < 3 vezes o limite superior da normalidade	Bilirrubina total normal com TGP ≥ 3 vezes até 5 vezes o limite superior da normalidade ou FA ≥ 3 vezes o limite superior da normalidade	Bilirrubina total elevada, mas ≤ 3mg/dL ou TGP > 5 vezes o limite superior da normalidade	Bilirrubina total > 3 mg/dL

Quadro 3 - Classificação da DECH crônica (NIH 2014)

(continua)

Órgão/Sistema	**Score 1**	**Score 2**	**Score 3**	**Score 4**
Pulmão (escore de sintomas)	Sem sintomas	Sintomas leves (dispneia após subir um lance de escadas)	Sintomas moderados (dispneia após caminhar em superfície plana)	Sintomas graves (dispneia em repouso, necessidade de oxigênio suplementar)
Pulmão (escore de função pulmonar – VEF1)	VEF1 ≥ 80%	VEF1 60 - 79%	VEF1 40 - 59%	VEF1 ≤ 39%
Articulações e fáscias	Sem sintomas	Enrijecimento leve dos braços ou pernas, mobilidade normal ou com leve diminuição, sem afetar as atividades diárias	Enrijecimento dos braços ou pernas ou contratura das articulações, eritema devido à fasciíte, redução moderada da mobilidade e limitação leve a moderada das atividades diárias	Contraturas com diminuição significativa da mobilidade e limitação significativa das atividades diárias (incapacidade para amarrar sapatos, abotoar camisa, vestir-se)
Trato genital	Sem sinais	Sinais leves (avaliação do especialista) com ou sem desconforto no exame ginecológico nas mulheres	Sinais moderados (avaliação do especialista) com possíveis sinais de desconforto no exame ginecológico em mulheres	Sinais graves (avaliação do especialista) com ou sem sintomas
Pontos-chaves				
Pele: Necessário escore maior do que 2 para ser usado para calcular a gravidade global Pulmão: Quando possível, utilizar o escore dos sintomas e do VEF1. O score do VEF1 é usado, ao invés do clínico, para calcular a gravidade global quando há diferença entre os dois escores. Se toda anormalidade relacionada a um órgão for explicada por outra causa, o órgão não é incluído para calcular a gravidade global. Se a anormalidade em um órgão for atribuída a causas multifatoriais, o escore do órgão será usado para calcular a gravidade global sem levar em consideração as causas contribuintes.				

Quadro 3 - Classificação da DECH crônica (NIH 2014)

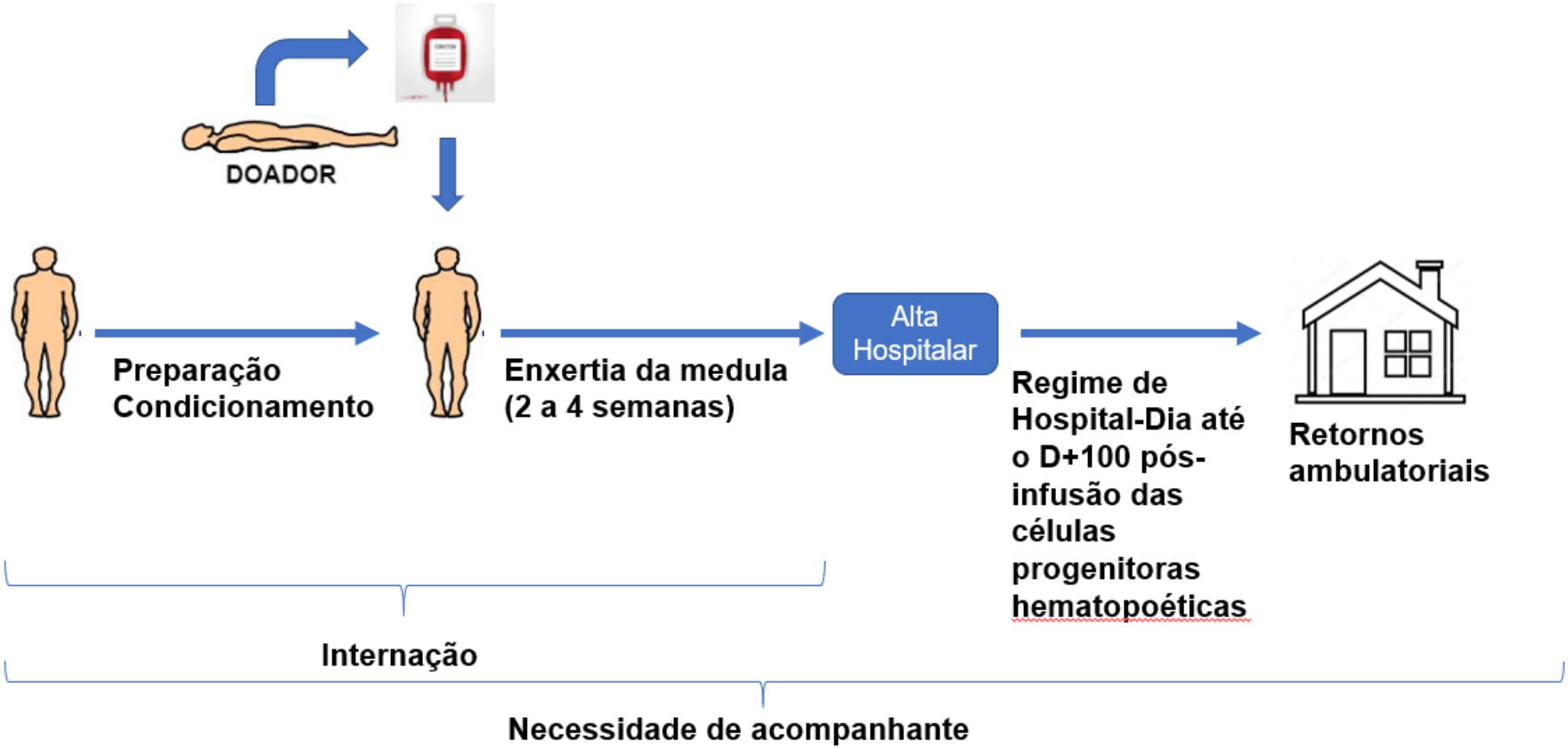
(conclusão)

Classificação	***Critérios***
Leve	Até dois órgãos com escore 1, exceto pulmão
Moderada	Qualquer outro escore não incluído nas categorias leve ou grave
Grave	Pelo menos um órgão com escore 3 ou pulmão com escore 2

DECH, doença do enxerto contra o hospedeiro; NIH, Instituto Nacional de Saúde americano, do inlêns *National Institutes of Health*; SC, superfície corporal; TGP, transaminase glutâmico-pirúvica; FA, fosfatase alcalina; VEF1, volume expiratório forçado no primeiro segundo; Fonte: adaptação de Jagasia *et al.* (2015).

APÊNDICES

APÊNDICE A – Programação do transplante de células progenitoras hematopoéticas alogênico para tratamento da doença falciforme



Fonte: Adaptação de Riul e Aguillar (1997).

APÊNDICE B – Avaliação individual dos marcadores relacionados à doença falciforme

Tabela 16 - Marcadores séricos relacionados à doença falciforme nos períodos pré-TCPH e 24 meses pós-TCPH, no grupo estudo.

ID	Hb (g/dL) Pré-TCPH	Hb (g/dL) Pós-TCPH	Reticulócitos (10^6/ml) Pré-TCPH	Reticulócitos (10^6/ml) Pós-TCPH	BI (mg/dL) Pré-TCPH	BI (mg/dL) Pós-TCPH	DHL (UI/L) Pré-TCPH	DHL (UI/L) Pós-TCPH	HbS (%) Pré-TCPH	HbS (%) Pós-TCPH
RPE001	8,5	15,3	0,022	0,037	1,63	0,23	729	297	27,3	0,0
RPE002	9,1	9,2	0,069	0,104	0,64	0,90	472	410	32,1	72,8
RPE003	11,8	9,8	0,074	0,299	1,04	1,68	525	447	44,0	81,3
RPE004	9,3	14,8	0,028	0,073	3,62	0,34	219	313	29,3	42,4
RPE005	10,5	12,7	0,066	0,072	0,66	0,35	511	394	25,0	36,7
RPE006	10,5	10,6	0,012	0,042	1,72	1,06	845	632	49,5	53,4
RPE007	10,8	16,0	0,166	0,081	1,86	0,38	770	307	39,7	0,0
RPE008	9,3	12,4	0,074	0,060	3,15	0,72	451	227	75,5	39,8
RPE009	7,6	13,6	0,022	0,089	1,45	0,52	834	353	71,8	38,5
RPE010	9,9	13,8	0,164	0,167	0,64	0,20	530	394	50,4	36,3
RPE011	9,8	8,0	0,192	0,529	1,64	1,49	919	743	27,6	64,4
RPE012	10,1	16,9	0,010	0,073	1,00	0,96	611	297	42,0	38,3
RPE013	9,8	16,2	0,054	0,251	1,78	0,75	NA	233	34,7	0,0
RPE014	9,1	15,8	NA	0,113	1,56	0,24	856	358	31,5	35,9
RPE015	10,7	12,2	0,182	0,070	2,41	0,27	753	357	34,3	38,4
RPE016	11,5	16,0	0,138	0,078	1,89	0,57	627	362	38,0	38,0
RPE017	8,0	11,1	0,743	0,069	1,33	0,34	878	458	31,1	37,8
RPE018	7,1	12,1	0,182	0,173	3,22	0,45	763	423	43,3	41,7
RPE019	9,1	14,0	NA	0,064	2,66	0,21	631	537	38,4	0,0
RPE020	10,0	13,9	NA	0,245	6,04	0,88	NA	446	85,2	39,3
RPE021	7,6	NA	0,142	NA	1,01	NA	522	NA	65,9	NA

TCPH, transplante de células progenitoras hematopoéticas; ID, identificação; Hb, hemoglobina; BI, bilirrubina indireta; DHL, desidrogenase lática; HbS, hemoglobina S; NA, não avaliado