



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

FRANCINE CHENOU

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA HIDROXIUREIA SOBRE MARCADORES
DE HEMÓLISE INTRAVASCULAR, DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E DE
HIPERCOAGULABILIDADE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

**CAMPINAS
2020**

FRANCINE CHENOU

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA HIDROXIUREIA SOBRE MARCADORES
DE HEMÓLISE INTRAVASCULAR, DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E DE
HIPERCOAGULABILIDADE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências, *Área
de Concentração em Patologia Clínica*.

ORIENTADOR: PROF. DR. MAGNUN NUELDO NUNES DOS SANTOS

COORIENTADOR: PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA FRANCINE
CHENOU E ORIENTADA PELO PROF. DR. MAGNUN
NUELDO NUNES DOS SANTOS.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C421a Chenou, Francine, 1988-
Avaliação da influência da hidroxiureia sobre marcadores de hemólise intravascular, de disfunção endotelial e de hipercoagulabilidade em pacientes com anemia falciforme / Francine Chenou. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Magnun Nuelo Nunes dos Santos.
Coorientador: Erich Vinicius de Paula.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Anemia falciforme. 2. Hidroxiureia. 3. Hemólise intravascular. 4. Disfunção endotelial. 5. Hipercoagulabilidade. I. Santos, Magnun Nuelo Nunes dos, 1984-. II. De Paula, Erich Vinicius, 1972-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of hydroxyurea influence on intravascular hemolysis, endothelial dysfunction and hypercoagulability markers in patients with sickle cell anemia

Palavras-chave em inglês:

Sickle cell anemia

Hydroxyurea

Intravascular hemolysis

Endothelial dysfunction

Hypercoagulability

Área de concentração: Patologia Clínica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Magnun Nuelo Nunes dos Santos [Orientador]

Mônica Barbosa de Melo

Paula de Melo Campos

Marilda de Souza Gonçalves

Antonio Roberto Lucena de Araújo

Data de defesa: 17-07-2020

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2067-5510>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6647537582206713>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

FRANCINE CHENOU

ORIENTADOR: PROF. DR. MAGNUN NUELDO NUNES DOS SANTOS

COORIENTADOR: PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DR. MAGNUN NUELDO NUNES DOS SANTOS

2. PROFA. DRA. MONICA BARBOSA DE MELO

3. PROFA. DRA. PAULA DE MELO CAMPOS

4. PROFA. DRA. MARILDA DE SOUZA GONÇALVES

5. PROF. DR. ANTONIO ROBERTO LUCENA DE ARAÚJO

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 17/07/2020

DEDICATÓRIA

À minha filha Donan Marie-Onélia, minha princesa, que deu um sentido especial à minha existência e me tem proporcionado grandes momentos de alegria.

Aos meus pais, Amavi Paul e Josephine, que me incentivaram e apoiaram durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, quero agradecer a Deus, por me conceder saúde, força e sabedoria, para que eu pudesse finalizar mais uma etapa de sonhos e realizações. A ti, Senhor, toda honra e toda a glória.

Aos meus pais, Amavi Paul Chenou e Josephine Togbe, por terem me dado condições para uma ótima educação. Obrigada por acreditarem em mim, e que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Amo vocês com amor eterno.

À minha família (meus irmãos e sobrinhos), pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional. Obrigada por acreditar no meu sonho e sempre me impulsionaram em direção às vitórias dos meus desafios. É muito bom saber que posso contar com vocês em todos os momentos.

Ao meu marido Bidossessi Wilfried, companheiro e amigo de todas as horas, que contribuiu decisivamente para que esta tese pudesse ser concluída. Obrigada pelo amor e carinho em todos os momentos da minha vida. Você me deu apoio e incentivo nas horas difíceis de desânimo e cansaço. Eu te amo.

Aos meus sogros e cunhados, pelo apoio. Vocês me amam, torcem por mim e ficam felizes com cada conquista em minha vida, mesmos distantes, estão por perto. Obrigada pelo amor incondicional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Magnun Nunes Nueldo dos Santos, pelo investimento, compreensão, orientações e disponibilidade em vários momentos. Obrigada pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança e por todos os ensinamentos compartilhados de forma admirável. Aqui lhe exprimo a minha gratidão.

Ao coorientador Prof. Dr. Erich Vinicius De Paula, pelo apoio, a disponibilidade, as discussões e reflexões que foram fundamentais na elaboração desse trabalho. Fico muito grata.

À Profa. Dra. Maria Fátima Sonati, por abrir as portas do seu laboratório para mim. Agradeço pela sua disponibilidade e apoio incondicional prestado, a forma interessada e pertinente como acompanhou a realização deste trabalho. As suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso. Muito obrigada.

À Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves, pela iniciativa, elaboração e a realização do projeto CNPQ/BENIN-NIGÉRIA, que me permitiu continuar meu estudo no Brasil. Agradeço pelo apoio incondicional prestado, confiança depositada em mim. Muito obrigada e que Deus continue a lhe abençoar.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pela colaboração nesta pesquisa.

Aos professores da banca examinadora deste trabalho, Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves, Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo, Profa. Dra. Mônica Melo e Dra. Paula de Melo Campos, por ter aceitado o convite de participar da minha banca. Muito obrigada pelas sugestões, considerações e pelo tempo despendido, para avaliar esta tese, que sem dúvida, guiaram a confecção final deste trabalho.

Às amigas do laboratório, Bruna, Danaê, Gisele, Paula, Marcela e Susan, pela amizade, apoio e carinho em todos os momentos e que me ajudou a dividir os problemas e a somar alegrias.

Ao pessoal dos Laboratórios de Hemoglobina e Genoma e de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP, do Laboratório de Hemoglobinopatias do Hemocentro de Pernambuco (HEMOPE) e do Laboratório Central/CCB/UFPE, em especial aos Profs Marcos Bezerra e Igor Domingos e aos alunos de pós-graduação Gabriela Arcanjo, Thaís Batista e Rodrigo Santana, que contribuíram para a realização deste trabalho. Além disso, agradeço a todos aqueles, que de uma maneira ou de outra contribuíram, para que este percurso pudesse ser concluído. Muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Processo nº 2014/00984-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

RESUMO

Na anemia falciforme (AF), a hemólise intravascular (HI), a disfunção endotelial (DE) e a inflamação estão entre os fatores mais importantes que contribuem para o desenvolvimento da hipercoagulabilidade. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar a associação entre marcadores de HI [Contagem de reticulócitos, lactato desidrogenase (LDH), hemoglobina plasmática (pHb), heme total e sCD163], marcadores de DE [antígeno do fator de von Willebrand (FvW:Ag), atividade do cofator da ristocetina de FvW (FvW:RCo), antígeno de ADAMTS13 (ADAMTS13:Ag), atividade de ADAMTS13 (ADAMTS13:Act), trombospondina-1(TSP1) e endotelina-1(ET-1)] e marcadores de hipercoagulabilidade [dímero-D, fibrinogênio e complexo trombina-antitrombina (TAT)], em pacientes brasileiros com AF com e sem uso de hidroxiureia (HU). O estudo transversal incluiu 30 pacientes não tratados com HU (HbSS) e 25 pacientes em terapia com HU (HbSS_HU) atendidos no ambulatório de hemoglobinopatias do hemocentro de Pernambuco–HEMOPE, em Recife/PE, com idade mediana de 31 anos e 27,5 anos, respectivamente. Além disso, um grupo controle de 32 adultos, estudantes universitários saudáveis (HbAA) com idade mediana de 21,5 anos e afrodescendentes da mesma região geográfica, foram incluídos no estudo. Os níveis de TSP1, ADAMTS13:Ag, ET-1, sCD163, pHb e TAT foram quantificados por ELISA, enquanto as concentrações de LDH e heme total foram mensuradas por colorimetria. A dosagem do fibrinogênio e ADAMTS13:Act foi realizada por métodos turbidimétricos e FRETs-VWF73, respectivamente. Além disso, os níveis de dímero-D, FvW:Ag e FvW:RCo foram medidos por imunoturbidimetria. Em relação aos marcadores de HI, foi observado uma diminuição de níveis da LDH e pHb nos pacientes HbSS_HU quando comparados aos pacientes HbSS ($p_{LDH}=0,045$, $p_{pHb}=0,002$); enquanto os níveis de sCD163 e heme total se encontraram reduzidos e aumentados, respectivamente, nos pacientes com AF (com e sem HU) quando comparados aos controles ($p_{sCD163}=0,028$ e $p_{Heme}<0,0001$). Quanto aos marcadores de DE foi observado que FvW:Ag e FvW:RCo apresentaram níveis aumentados nos pacientes ($p<0,0001$), enquanto

ADAMTS13:Ag e ADAMTS13:Act diminuídos ($p_{\text{ADAMTS13:Ag}}=0,0007$; $p_{\text{ADAMTS13:Act}}<0,0001$) quando comparados aos controles. Já a TSP1 e ET-1 apresentaram níveis aumentados nos pacientes ($p_{\text{TSP1}}<0,0001$; $p_{\text{ET-1}}=0,013$). Com relação aos marcadores de hipercoagulabilidade, houve um aumento significativo de níveis de dímero-D e TAT nos pacientes quando comparados aos dos controles HbAA ($p<0,0001$); e os níveis de fibrinogênio estavam diminuídos em pacientes HbSS quando comparados aos dos controles e pacientes HbSS_HU ($p=0,011$). No que diz respeito às correlações encontradas entre os marcadores de HI e DE, os achados corroboram que a ativação anormal do endotélio nos pacientes com AF pode resultar, pelo menos em parte, do sequestro de NO provocado pela pHb e/ou heme. Adicionalmente, é possível sugerir que a DE favorece o quadro da hipercoagulabilidade nos pacientes com AF de acordo com as correlações observadas entre esses marcadores. Com base nos resultados obtidos, os marcadores da HI foram associados à maior ativação da DE e da coagulação na AF. Por outro lado, a terapia com HU foi relacionada a uma redução dos níveis de marcadores da HI e da DE, reforçando os benefícios do uso de HU na AF.

Palavras-chave: Anemia falciforme; hidroxiureia, hemólise intravascular; disfunção endotelial; hipercoagulabilidade

ABSTRACT

In sickle cell anemia (SCA), intravascular hemolysis (IH), endothelial dysfunction (ED) and inflammation are among the most important factors that contribute to the development of hypercoagulability. Thus, the present study aimed to evaluate the association between IH markers [Reticulocyte count, lactate dehydrogenase (LDH), plasma hemoglobin (pHb), total heme and sCD163], ED markers [von Willebrand factor antigen (vWF: Ag), vWF ristocetin cofactor activity (vWF:Rco), ADAMTS13 antigen (ADAMTS13: Ag), ADAMTS13 activity (ADAMTS13: Act), thrombospondin-1 (TSP1) and endothelin-1 (ET-1)] and markers of hypercoagulability [D-dimer, fibrinogen and thrombin-antithrombin complex (TAT)] in Brazilian SCA patients with and without the hydroxyurea (HU) therapy. The cross-sectional study included 30 SCA patients not treated with HU (HbSS) and 25 SCA patients on therapy with HU (HbSS_HU), both groups followed up at the Hematology and Hemotherapy Center of Pernambuco (HEMOPE), Recife, with a median age of 31 years and 27.5 years, respectively. In addition, a control group of 32 adults, healthy university students (HbAA) with a median age of 21.5 years and African descent from the same geographic region, were included in the study. The levels of TSP1, ADAMTS13: Ag, ET-1, sCD163, pHb and TAT were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), while the concentrations of LDH and total heme were measured by colorimetry. The measurement of fibrinogen and ADAMTS13: Act were performed by turbidimetric and FRETs-VWF73 methods, respectively. In addition, D-dimer, vWF: Ag and vWF: RCo levels were measured by immunoturbidimetry. Regarding IH markers, LDH and pHb levels were significantly lower in HbSS_HU patients than HbSS patients ($p_{LDH} = 0.045$, $p_{pHb} = 0.002$); while the levels of sCD163 and total heme significantly decreased and elevated, respectively, in HbSS and HbSS_HU patients compared to HbAA controls ($p_{sCD163} = 0.028$ and $p_{Heme} < 0.0001$). In relation to the ED markers, vWF: Ag and vWF: RCo levels were increased in SCA patients than HbAA controls ($p < 0.0001$), while ADAMTS13: Ag and ADAMTS13: Act were decreased in SCA patients than HbAA controls ($p_{ADAMTS13:Ag} = 0.0007$; $p_{ADAMTS13:Act}$

<0.0001). In addition, TSP1 and ET-1 levels were elevated in patients ($p_{\text{TSP1}} < 0.0001$; $p_{\text{ET-1}} = 0.013$). Regarding the markers of hypercoagulability, there was a significant increase in the levels of D-dimer and TAT in patients when compared to those of the HbAA controls ($p < 0.0001$); and fibrinogen levels were decreased in HbSS patients when compared to controls and HbSS_HU patients ($p = 0.011$). Regarding the correlations between the IH and ED markers, the findings corroborate that the abnormal activation of the endothelium in patients with SCA may result, at least in part, from the NO sequestration caused by pHb and / or heme. Additionally, it is possible to suggest that ED favors the picture of hypercoagulability in patients with SCA according to the correlations observed between these markers. Based on the results obtained, the IH markers were associated with greater activation of ED and coagulation in SCA. On the other hand, HU therapy was related to a reduction in the levels of IH and ED markers, reinforcing the clinical benefit for the use of HU in SCA.

Keywords: Sick cell anemia; hydroxyurea; intravascular hemolysis; endothelial dysfunction, hypercoagulability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mecanismo fisiopatológico da anemia falciforme..	20
Figura 2: Mecanismos de defesa contra a toxicidade de Hb livre e heme livre.	22
Figura 3: Estrutura e função do pré-pró-FvW. Éxons que codificam cada domínio são mostrados, juntamente com locais de ligação a ligantes.....	24
Figura 4: Descrição da síntese e processamento do FvW.	25
Figura 5: Mecanismo de ação dos inibidores competitivos de ADAMTS13.....	27
Figura 6: Múltiplos efeitos da administração de HU em pacientes com doença falciforme.....	30
Figura 7: Os níveis de hemoglobina fetal (HbF) nos pacientes.	38
Figura 8: Os marcadores de HI..	40
Figura 9: Os marcadores de DE.....	43
Figura 10: Os marcadores de hipercoagulabilidade.....	44
Figura 11: Correlação entre os marcadores de HI e DE em pacientes HbSS_HU...	47
Figura 12: Correlação entre os marcadores de HI e DE em pacientes HbSS..	48
Figura 13: Correlação entre os marcadores de DE e de hipercoagulabilidade em pacientes HbSS_HU.	49
Figura 14: Correlação entre os marcadores de DE e de hipercoagulabilidade em pacientes HbSS.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas e hematológicas dos controles HbAA e pacientes HbSS_HU e HbSS	37
Tabela 2: Frequências das complicações clínicas em pacientes HbSS_HU e HbSS	39
Tabela 3: Marcadores de HI em pacientes HbSS_HU, HbSS e em controles HbAA	41
Tabela 4: Marcadores de DE em controles HbAA e em pacientes HbSS_HU e HbSS	43
Tabela 5: Marcadores de hipercoagulabilidade em controles HbAA e em pacientes HbSS_HU e HbSS	45
Tabela 6: Correlação entre os marcadores de HI e DE em pacientes HbSS_HU.....	46
Tabela 7: Correlação entre os marcadores de HI e DE em pacientes HbSS.....	48
Tabela 8: Correlação entre os marcadores de DE e de hipercoagulabilidade em pacientes HbSS_ HU	50
Tabela 9: Correlação entre os marcadores de DE e de hipercoagulabilidade em pacientes HbSS.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAMTS13 : A disintegrin-like and metalloprotease with trombospondin type 1 motifs

ADAMTS13:Ag: Antígeno de ADAMTS13

ADAMTS13:Act: Atividade de ADAMTS13

AF : Anemia falciforme

ET-1 : Endotelina-1

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média

DE : Disfunção endotelial

FvW: Ag : Antígeno de Fator de von Willebrand

FvW: RCo : Atividade de cofator de ristocetina de FvW

Hb : Hemoglobina

HbF : Hemoglobina F

HCM : Hemoglobina corpuscular média

HI : Hemólise intravascular

Hp : Haptoglobina

HU : Hidroxiureia

ICAM-1 : Molécula de adesão intercelular-1

LDH : Lactato desidrogenase

LEU : Leucócitos

MetHb : Metamoglobina

NO : Óxido nítrico

pHb: Hemoglobina plasmática

PLT : Plaquetas

RBC : Contagem de células vermelhas do sangue

RDW : Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos

sCD163 : CD163 solúvel

TAT : Complexo trombina-antitrombina

TEP : Tromboembolismo pulmonar

TSP1 : Trombospondina-1

UL- FvW : Multímeros do FvW

VCAM-1 : Molécula de adesão da célula vascular-1

VCM : Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Hemoglobinopatias	18
1.2. Anemia Falciforme	18
1.3. Fisiopatologia da doença	19
1.3.1. Hemólise intravascular na AF	20
1.3.2. Mecanismos de defesa contra a toxicidade de Hb livre e heme livre	21
1.3.3. Disfunção endotelial na AF	23
1.3.4. Hipercoagulabilidade na AF	27
1.4. Uso de hidroxíureia para tratamento da AF	28
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo geral	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. Casuística	32
4.2. Aspectos Éticos da Pesquisa	32
4.3. Separação das amostras	32
4.4. Análises hematológicas e coleta dos dados clínicos	33
4.5. Determinação das concentrações plasmáticas ou séricas dos marcadores de hemólise intravascular	34
4.6. Determinação das concentrações plasmáticas dos marcadores de disfunção endotelial	34
4.7. Determinação das concentrações plasmáticas dos marcadores de hipercoagulabilidade	35
4.8. Análise estatística	35
5. RESULTADOS	36
5.1 Características demográficas e hematológicas dos controles HbAA e pacientes HbSS_HU e HbSS	36
5.2. Complicações clínicas dos pacientes HbSS_HU e HbSS	38
5.3. Marcadores de hemólise intravascular em controles e pacientes	39
5.4. Marcadores de disfunção endotelial em controles e pacientes	41
5.5. Marcadores de hipercoagulabilidade em controles e pacientes	44
5.6. Correlação entre os marcadores de hemólise intravascular e disfunção endotelial em pacientes com AF	45
5.7. Correlação entre os marcadores de DE e hipercoagulabilidade em pacientes com AF	49
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÕES	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
9. APÊNDICES	69
9.1. Resumo apresentado em congresso internacional ASH 2017	69
9.2. Resumo apresentado em congresso nacional Hemo 2019	71
9.3. Artigo publicado	72
10. ANEXOS	87
10.1. Parecer do CEP da UNICAMP	87
10.2. Parecer do CEP do HEMOPE	92
10.3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	95
10.4. Autorização da revista Biochemical Genetics	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são doenças hereditárias da hemoglobina (Hb) que afetam cerca de 7% da população mundial (1). Essas doenças intrínsecas da Hb podem ser classificadas em dois grandes grupos: as alterações de estrutura (Hbs estruturalmente anormais), e as alterações do ritmo de síntese (talassemias) (2). Além disso, com menor frequência, ambos os fenótipos podem estar associados. Entre os defeitos estruturais mais importantes está o da HbS ($\alpha_2\beta^S_2$), conhecida pela gravidade e frequência, particularmente entre os povos africanos ou afro-descendentes (3).

1.2. Anemia Falciforme

A anemia falciforme (AF) é uma doença monogenética autossômica recessiva causada pela homozigose de uma única mutação [HBB: c.20A>T (p.Glu7Val)] no sétimo códon do gene que codifica a globina β , com a origem da hemoglobina variante denominada hemoglobina S (HbS) (4). Esta mutação leva à substituição de um resíduo de ácido glutâmico por um resíduo de valina (glu7val) na sétima posição da cadeia polipeptídica da globina β (5). A AF é uma das doenças monogenéticas mais comuns no mundo e estimativas recentes sugerem o nascimento anual de pouco mais de 312.000 crianças com AF (4). Estudos sugerem que as mutações da HbS tiveram cinco origens distintas na África equatorial e, talvez, no Oriente Médio e na Índia; e com o fluxo migratório das populações, se espalhou por todo o mundo (6,7). No Brasil, a AF é a doença genética mais prevalente e se distribui de forma heterogênea, sendo mais frequente em populações onde a proporção de antepassados negros é predominante, como a região nordeste que recebeu o maior fluxo migratório de escravos africanos (8). De acordo com os dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal (9), estima-se a existência de dois milhões de heterozigotos e mais de 50 mil homozigotos desse gene na população brasileira.

1.3. Fisiopatologia da doença

A polimerização da HbS é o evento primário na patogênese molecular da AF. A taxa e a extensão da polimerização da HbS circulante dependem, principalmente, de três variáveis independentes: o grau de desoxigenação da Hb, a concentração de HbS intracelular e a concentração de HbF (10,11). No interior dos eritrócitos, sob baixas tensões de oxigênio, a HbS pode polimerizar, modificando sua forma e tornando-os falcizados. A falcização pode ser revertida quando níveis elevados de oxigênio são novamente atingidos. Assim, as repetições dos ciclos de falcização causam danos irreversíveis ao citoesqueleto da membrana de hemácia, representando as hemácias irreversivelmente falcizadas, observadas no esfregaço do sangue periférico. As hemácias falciformes danificadas contribuem para o processo de vaso-oclusão e são destruídas rapidamente, levando a anemia hemolítica (12), Figura 1. A vaso-oclusão diminui a perfusão de órgãos, levando ao infarto tecidual e, juntos com anemia hemolítica, causam as complicações clínicas associadas à doença, tais como: episódios de crises vaso-oclusivas (CVO), auto infarto esplênico, síndrome torácica aguda (STA), hipertensão pulmonar, acidente vascular cerebral (AVC), danos orgânicos multissistêmicos e a morte precoce (13).

A vaso-oclusão na AF constitui um processo multifatorial complexo em que as interações entre eritrócitos e células endoteliais, leucócitos e plaquetas desempenham um papel importante. As células endoteliais são ativadas pelo contato direto dos eritrócitos falciformes, heme livre, Hb livre e espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas por hipóxia (14). A ativação do endotélio resulta na indução da expressão das moléculas de adesão endotelial como a molécula 1 de adesão celular vascular (VCAM1), molécula 1 de adesão intercelular (ICAM1), P-selectina, E-selectina, antígeno de superfície de leucócitos CD47 e $\alpha V\beta 3$ integrina, que medeiam a adesão de eritrócitos e leucócitos à parede dos vasos (15–17). As células endoteliais ativadas produzem também mediadores inflamatórios, como IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral α (TNF- α), que levam a um estado inflamatório crônico (14,18). O meio inflamatório pode promover a ativação de neutrófilos, monócitos e plaquetas, levando a uma maior adesão entre si e ao endotélio ativado e contribui para a redução do fluxo sanguíneo e, eventualmente, obstrução à micro-circulação (18). A biodisponibilidade reduzida do óxido nítrico, causada principalmente pelo seu consumo pela Hb livre, liberada durante a hemólise

intravascular, contribui para esse processo, facilitando a atividade da vasoconstrição e da molécula de adesão (19). Assim sendo, as interações das células endoteliais desempenham um papel importante em todos os mecanismos que participam no processo vaso-oclusivo e em grande parte da fisiopatologia da AF.

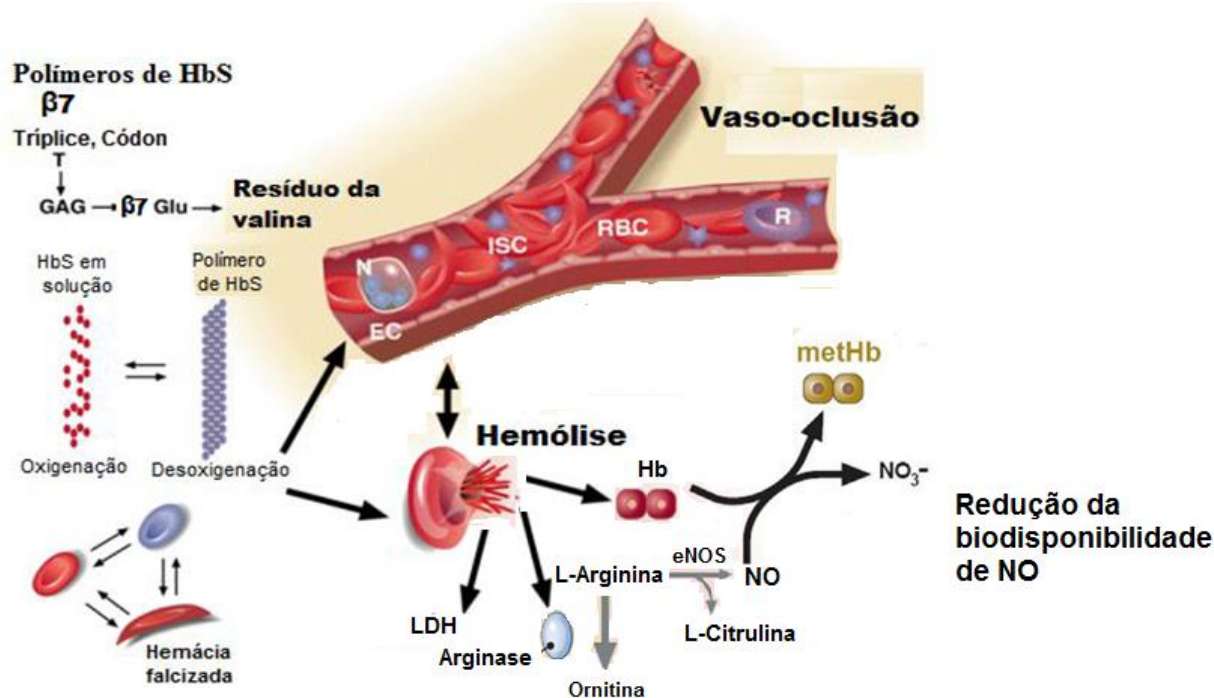


Figura 1: Mecanismo fisiopatológico da anemia falciforme. *Adaptada de Steinberg et al., 2008 (20).*

1.3.1. Hemólise intravascular na AF

Os eritrócitos falcizados são altamente instáveis, com uma vida útil de 7 a 14 dias em comparação aos 120 dias dos eritrócitos normais. A maior parte da hemólise acontece no espaço extravascular, porém, cerca de 30% dessa destruição ocorre no compartimento intravascular (20). A hemólise intravascular (HI) resulta na liberação de hemoglobina (Hb), heme e enzimas tais como arginase e lactato desidrogenase (LDH) na circulação. Uma vez na circulação, a Hb livre é rapidamente oxidada e libera heme, que consomem óxido nítrico (NO, gás vasodilatador), produzindo nitrato inerte e metamoglobina (MetHb), que é incapaz de transportar oxigênio. Por outro lado, a enzima arginase converte a L-arginina, substrato para a produção de NO por óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), em ornitina, diminuindo assim a disponibilidade de L-arginina para a síntese de NO (21,22), (Figura 1). O fenômeno da vasoconstrição é resultante do sequestro deste

gás e consumo do substrato e, por sua vez, retarda o fluxo sanguíneo, favorece o processo de falcização dos eritrócitos falciformes, aumenta a ativação plaquetária e a expressão das moléculas de adesão nos leucócitos e nas células endoteliais, comprometendo, assim, a integridade do endotélio vascular e promovendo a adesão dos eritrócitos e dos leucócitos (12,23).

1.3.2. Mecanismos de defesa contra a toxicidade de Hb livre e heme livre

O mecanismo de defesa do organismo contra os efeitos deletérios da Hb livre é estabelecido pela proteína haptoglobina (Hp). Ela liga-se avidamente aos dímeros de Hb, formando um complexo altamente estável (Hp-Hb), impedindo a excreção renal de ferro e protegendo os vasos de seus efeitos oxidativos (24,25). Este complexo Hb-Hp liga-se a receptores CD163 expressos na superfície dos macrófagos do baço, fígado, medula óssea e rins e são removidos dos vasos (26). No entanto, a Hp pode ser rapidamente saturada (Figura 2). Uma vez que o sistema de eliminação da Hb livre é sobrecarregado pelo processo de hemólise intravascular, a oxidação da Hb pode ocorrer e, conseqüentemente, a liberação de heme livre na circulação. O heme livre é rapidamente eliminado por uma segunda glicoproteína plasmática envolvida no processo de desintoxicação: hemopexina (Hx) (27). Estes complexos são internalizados principalmente no fígado através dos receptores CD91. Uma vez dentro da célula, o heme é processado pela enzima heme-oxigenase, levando à liberação de monóxido de carbono, biliverdina e ferro (Figura 2) (28,29). No entanto, quando o sistema de eliminação é sobrecarregado pelo processo de HI, assim como na AF, a Hb/heme livre desencadeiam a depleção do NO, estresse oxidativo, disfunção endotelial e exposição de ferro da Hb/heme aos rins (21,22,30).

Na resposta inflamatória, o receptor CD163 da superfície de monócitos/macrófagos pode ser clivado por metaloproteinases de matriz ADAM17/TACE (*tumor necrosis factor α -converting enzyme*) resultando em CD163 solúvel (sCD163) (Figura 2) (31). Porém, mesmo sem estímulos inflamatórios, pequenas quantidades de sCD163 são liberadas constitutivamente na circulação, e níveis relativamente altos de sCD163 (0,7 – 3.9 mg/L) são observados em indivíduos saudáveis (32). O sCD163 pode ligar-se aos complexos Hp-Hb quando ocorre no

soro excesso desse complexo, como no caso de hemólise crônica (33). Desta forma, os níveis baixos deste receptor solúvel podem indicar um maior grau de hemólise.

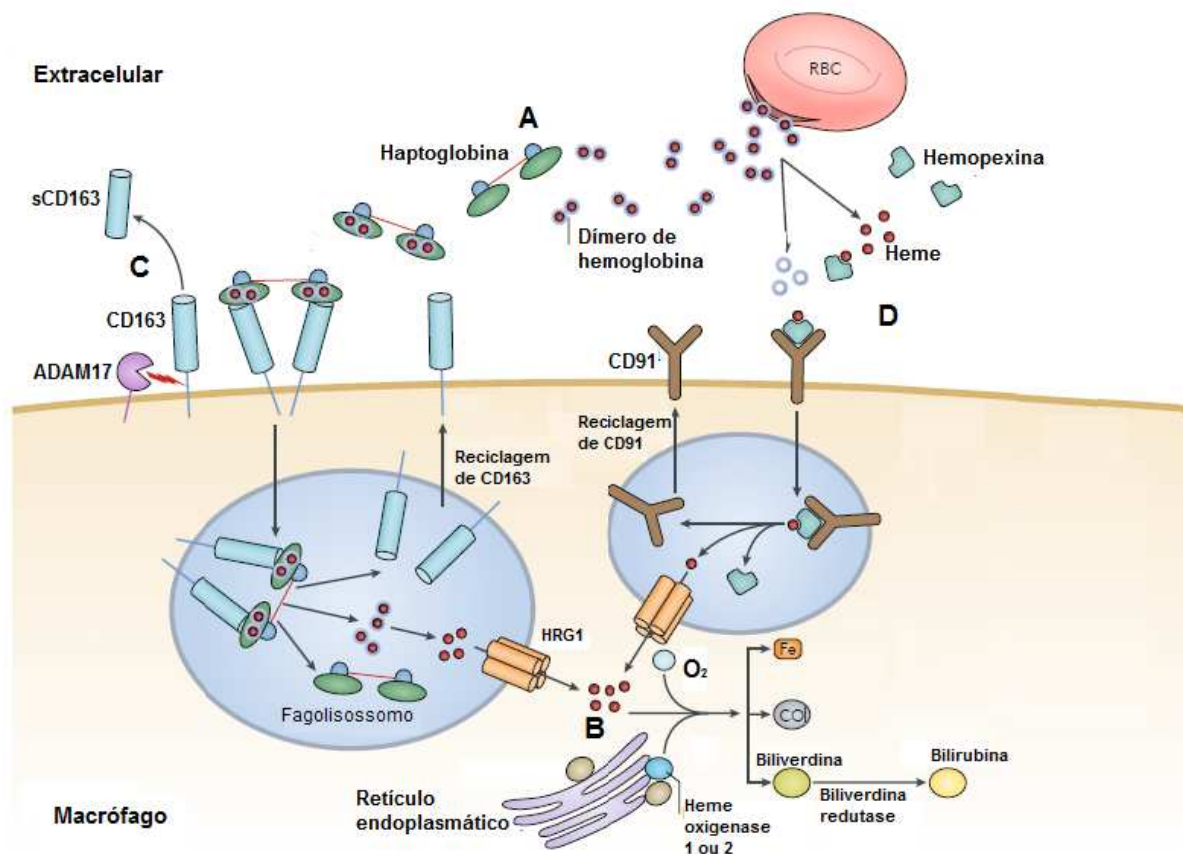


Figura 2: Mecanismos de defesa contra a toxicidade de Hb livre e heme livre. *Adaptada de Bulters et al., 2018 (34)*

A: Os dímeros de Hb podem ser capturados pela haptoglobina e o complexo haptoglobina-hemoglobina liga-se a receptores CD163 expressos na superfície dos macrófagos e são removidos dos vasos por endocitose. Após a endocitose, o receptor CD163 é reciclado, o complexo Hp-Hb é catabolizado nos fagolisossomos; a Hp não é reciclada e a hemoglobina é então degradada para liberar o heme. **B:** o grupo heme é degradado pela ação da enzima heme-oxigenase, levando à liberação de monóxido de carbono, ferro e biliverdina, que posteriormente é convertida em bilirrubina. **C:** Na resposta inflamatória, o receptor CD163 da superfície de monócitos/macrófagos pode ser clivado por metaloproteinases de matriz ADAM17 resultando em CD163 solúvel (sCD163). **D:** o heme extracelular livre pode ser capturado pela hemopexina e transportado pelos macrófagos via CD91, onde também é degradado para produzir ferro, monóxido de carbono e biliverdina.

1.3.3. Disfunção endotelial na AF

O endotélio vascular desempenha papel crucial na vaso-oclusão e na isquemia de órgãos-alvo por meio de vários mecanismos, os quais incluem a regulação da hemostasia e do tônus vascular, a adesão de hemácias e leucócitos, e a lesão provocada pela isquemia/reperfusão (35). A AF é acompanhada de ativação sistêmica do endotélio vascular, tornando o endotélio mais adesivo para as células sanguíneas, incluindo as hemácias falcizadas (36). Assim, a ativação excessiva do endotélio e a vasoconstrição resultante do consumo do NO e produção da endotelina-1 (gás vasoconstritor) podem contribuir para a instabilidade vascular observada nos pacientes com AF (37).

Os multímeros do FvW (UL-FvW), marcadores de ativação endotelial, são sintetizados pelas células endoteliais e megacariócitos. Essa proteína funciona como transportadora e protetora do fator VIII e também atua como mediadora da adesão plaquetária ao endotélio, após danos à parede dos vasos sanguíneos (38,39). O UL-FvW é uma glicoproteína multimérica com subunidades monoméricas de 2050 aminoácidos (aa), e aproximadamente 250 kDa de massa molecular com os principais domínios D'-D3-A1A2A3-D4-B1B2B3-C1C2CK (40). Ele passa por várias etapas de processamento intracelular após a síntese da proteína precursora de 2813 aa, que consiste num peptídeo sinalizador de 22 aa, um pró-peptídeo de 741 aa e uma subunidade madura de FvW de 2050 aa (Figura 3) (41). Após remoção do peptídeo sinalizador no retículo endoplasmático, os pró-FvW formam dímeros ligados entre si na porção carboxiterminal por pontes dissulfeto. Estes dímeros são transportados do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, onde eles se unem através de ligações dissulfeto N-terminal para formar multímeros de FvW após a clivagem do pró-peptídeo pela enzima furina (Figura 4) (40,42). Os multímeros de FvW com mais de 10.000 kDa de massa molecular são estocados nos corpúsculos de Weibel-Palade nas células endoteliais e nos grânulos alfa das plaquetas, onde são liberados por estimulação das respectivas células (41,42). Quando ocorre o dano vascular, o colágeno subendotelial é exposto e o FvW liga-se a ele no domínio A3. A ligação de FvW ao colágeno exposto causa uma alteração espacial do domínio A1 que permite a interação do FvW com o complexo GPIb-IX-V presente na superfície das plaquetas circulantes (41). Esse mecanismo serve para capturar plaquetas em circulação, que uma vez recrutadas podem ser ativadas e, por sua

vez, levam à apresentação de GPIIb/IIIa, que liga-se de maneira mais estável ao FvW através de seus domínios C para favorecer a formação de trombose intravascular (43).

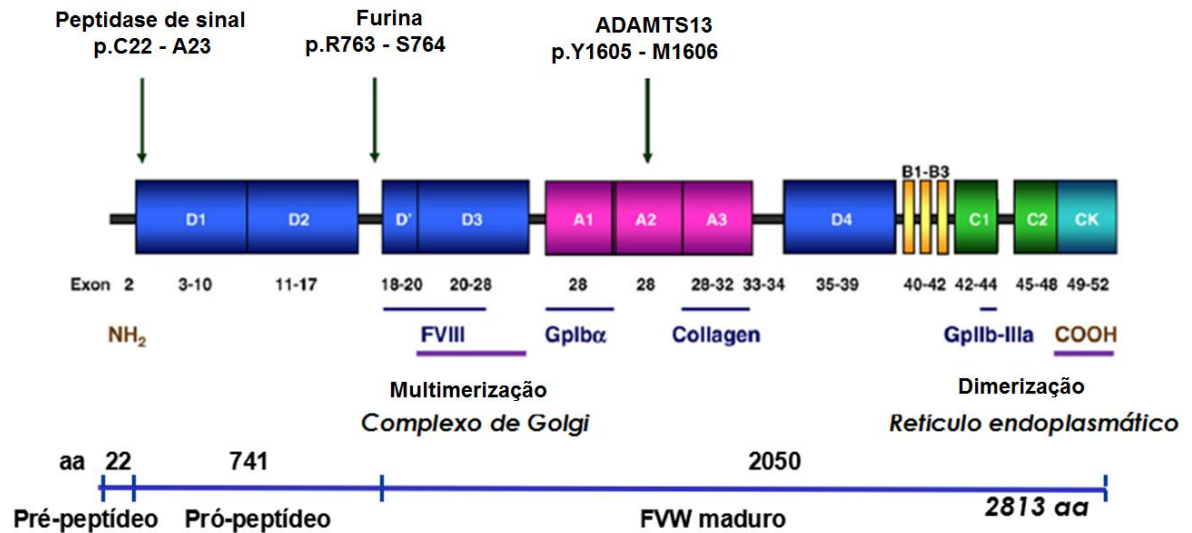


Figura 3: Estrutura e função do pré-pró-FvW. Éxons que codificam cada domínio são mostrados, juntamente com locais de ligação a ligantes. *Adaptada de Goodeve et al., 2010* (41)

O pré-pró-FvW consiste de um pré-peptídeo, pró-peptídeo com os domínios D1 e D2, e uma subunidade madura com os domínios D'-D3-A1A2A3-D4-B1B2B3-C1C2CK. O domínio D3 permite a ligação do FvW ao fator VIII. O domínio A1 está envolvido na ligação do FvW à glicoproteína Ib (GPIb) plaquetária. No domínio A2 encontra-se o sítio de ligação ao ADAMTS13. No domínio A3 encontra-se o sítio de ligação ao colágeno. Na porção carboxiterminal do domínio C2 encontra-se o sítio de ligação à glicoproteína IIb-IIIa (GPIIb-IIIa) plaquetária.

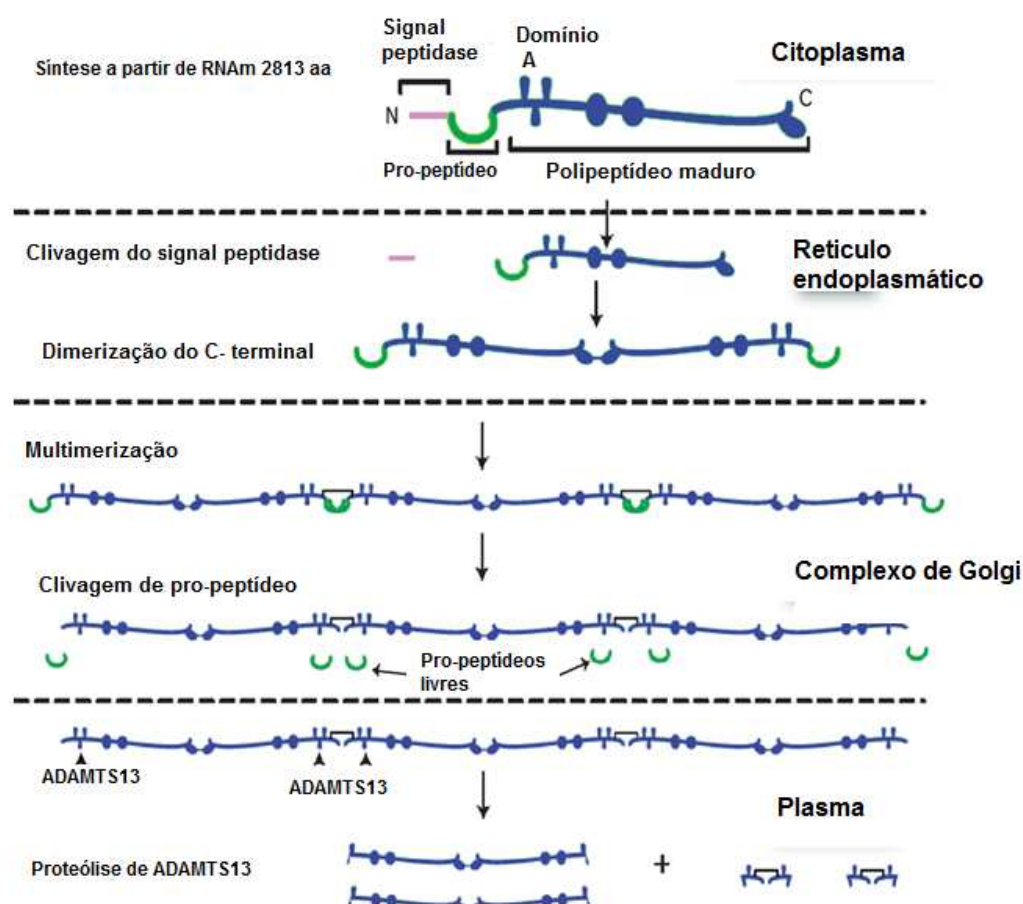


Figura 4: Descrição da síntese e processamento do FvW. Adaptada de López et al., 2004 (42)

Sob condições normais, os multímeros ULFvW são rapidamente clivados em pequenos fragmentos de FvW por uma protease plasmática denominada metaloprotease ADAMTS13 (*"a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs"*). A metaloprotease ADAMTS13 sintetizada pelas células endoteliais e hepáticas liga-se ao domínio central A2 do FvW de modo a clivar a ligação peptídica entre Tyr (1605) -Met (1606). Essa clivagem do FvW por ADAMTS13 facilita a liberação de pequenos fragmentos de FvW com menor atividade na circulação sanguínea (44), (Figura 4). Esses fragmentos de FvW circulantes são chamados antígeno de FvW (FvW:Ag) com tamanho de 500 kDa a 10000 kDa.

A hemólise grave libera uma grande quantidade de Hb livre, que, como agente oxidante, estimula as células endoteliais vasculares a secretar moléculas adesivas, incluindo ULFvW (39). Além disso, a Hb livre bloqueia a clivagem do

ULFvW, ligando-se diretamente ao domínio A2 do ULFvW, onde existe o local de clivagem da metaloprotease ADAMTS13, resultando no acúmulo de multímeros do FvW hiperreativos nas células endoteliais e na circulação (Figura 5). O nível elevado de Hb livre correlacionou-se inversamente com baixa atividade da metaloprotease ADAMTS13 em pacientes com hemólise grave, como AF (38). O nível elevado de Hb livre está associado com altos níveis de multímeros de FvW hiperreativos no plasma de pacientes com DF. Assim, o acúmulo de FvW hiperreativos não apenas promove a adesão das células falcizadas, mas também pode mediar as complicações trombóticas e vasooclusivas em pacientes com AF (45). Portanto, a interação Hb-FvW pode ser considerada como um alvo terapêutico para reduzir as complicações trombóticas e vasooclusivas mediadas pelo FvW em pacientes com AF (38).

Em pacientes com AF foram observados níveis aumentados de FvW e, em particular, multímeros do FvW hiperreativos, mesmo no estado clinicamente assintomático, indicando ativação endotelial contínua. Assim, pode ser necessária a elevação incomum da atividade da ADAMTS13, a fim de evitar aumentos anormais de fração de multímeros do FvW. A atividade insuficiente de ADAMTS13 pode, portanto, contribuir para a vaso-oclusão arterial e venosa na AF (36).

Em 2012, Novelli e colaboradores, relataram que pacientes com AF em estado estável da doença apresentavam níveis plasmáticos elevados de trombospondina-1 (TSP1) e que estes níveis estavam associados a complicações vaso-oclusivas e a histórico de síndrome torácica aguda (STA) (46).

A TSP1, através do seu receptor CD47, modula a resposta vascular à hipóxia, regula a vaso-constricção, inibe a angiogênese e o NO, e promove a adesão de eritrócitos falciformes ao endotélio, um evento desencadeante da vaso-oclusão (47,48). Estudos *in vitro* também têm mostrado que a TSP1 liga-se a multímeros do FvW e impede a sua degradação através da ADAMTS13, por inibição competitiva da atividade da metaloprotease (49,50), (Figura 5). Dessa forma, foi sugerido que altos níveis de TSP1 na AF conduzem à inibição da proteólise do FvW pela ADAMTS13 e podem representar uma via inesperada para a formação de multímeros do FvW nesta doença (51).

Recentemente, tem sido demonstrado que existe um subconjunto de pacientes com AF em estado estável da doença com uma combinação de atividade da ADAMTS13 indetectável, altos níveis circulantes de TSP1 e histórico de CVO e

de STA. Estes doentes não apresentam uma elevação acentuada dos marcadores hemolíticos, sugerindo talvez que multímeros do FvW hiperreativos podem acumular, como consequência da inibição da clivagem da ADAMTS13 causada pela TSP1, como alternativa para os efeitos inibitórios propostos para a Hb livre no sítio de clivagem da ADAMTS13 (51).

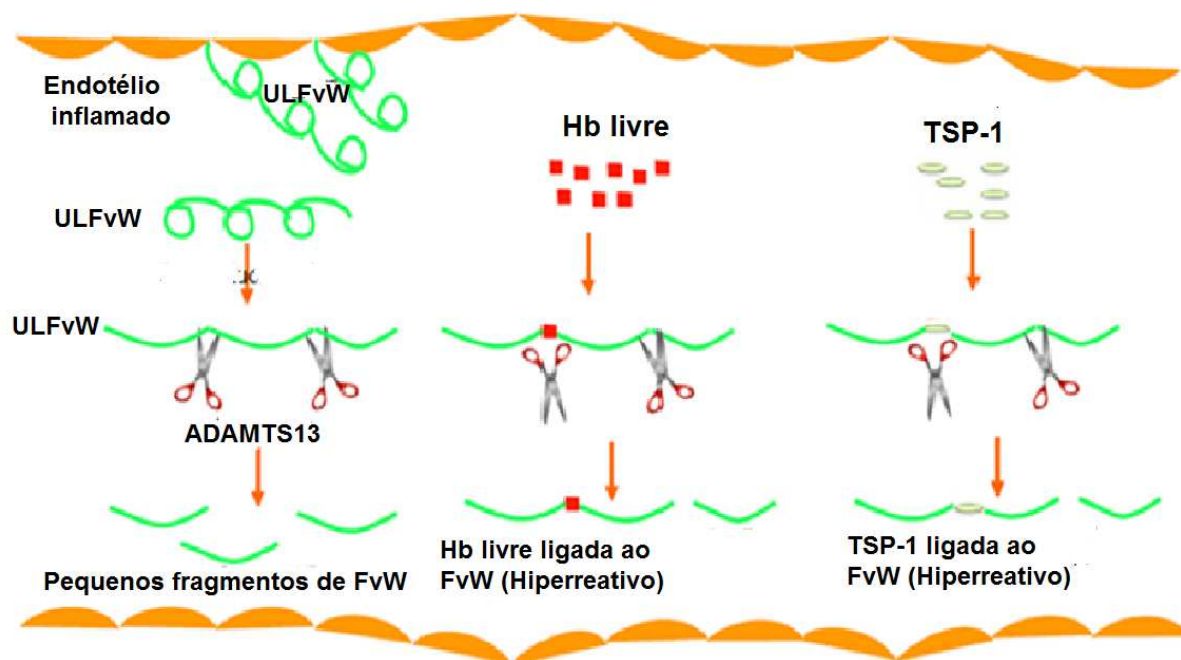


Figura 5: Mecanismo de ação dos inibidores competitivos de ADAMTS13. *Adaptada de Zhou et al., 2012 (45)*

Após a ativação do endotélio vascular, os multímeros de FvW (ULFvW) são liberados no plasma e são clivados por ADAMTS13 em pequenos fragmentos de FvW com menor atividade na circulação sanguínea. Sob as condições fisiopatológicas da AF, a hemoglobina (Hb) livre excessiva ou a trombospondina-1 (TSP-1) bloqueia a clivagem de uma subpopulação de ULFvW. Os ULFvW ligados a Hb livre ou TSP-1 não clivados ou parcialmente clivados se acumulam no plasma e são hiperreativos.

1.3.4. Hipercoagulabilidade na AF

Na AF, eventos trombóticos têm uma incidência elevada, com destaque para o tromboembolismo pulmonar (TEP) (52). A AF é caracterizada por um estado de hipercoagulabilidade que é observada mesmo em pacientes clinicamente estáveis (53). Porém, pacientes em crise álgica apresentaram uma prevalência maior de TEP do que pacientes controles (54) e o esperado na população geral. Além disso, o TEP parece contribuir de forma significativa para a gravidade das

crises (55). De fato, esses pacientes têm uma alta predisposição às manifestações tromboembólicas que levam a várias complicações graves tais como o AVC, embolia pulmonar, STA, danos orgânicos multissistêmicos e mesmo a morte precoce (22).

Tendo em vista essas observações, a fisiopatologia da hipercoagulabilidade em pacientes com AF tornou-se objeto de grande interesse nos últimos anos. As alterações funcionais de quase todos os compartimentos da hemostasia nestes pacientes apontam pelo pólo de hipercoagulabilidade. Além disso, os ciclos repetidos de lesão de reperfusão promovem a adesão dessas células falcizadas aos leucócitos e ao endotélio vascular (56), devido à presença de múltiplas moléculas de adesão, dificultando a circulação nas microcirculações e favorecendo a manutenção da hipercoagulabilidade e da inflamação crônica (22).

Os fatores que contribuem para a ativação crônica da coagulação na AF são hemólise, lesão de isquemia-reperfusão, inflamação, a depleção de NO, o aumento de níveis de FvW e TSP1. Os pacientes com AF apresentam níveis plasmáticos de trombina mais elevados, observados pelo seu fragmento de protrombina 1 + 2 (F1 + 2) e níveis aumentados do complexo trombina-antitrombina (TAT) (22). A trombina tem ação pró-coagulante, pois converte o fibrinogênio em fibrina, ativa as plaquetas e os fatores V, VIII, XI e XIII, que estabilizam o coágulo de fibrina (57). Além disso, o aumento da geração de trombina (58) pode promover o consumo crônico de anticoagulante natural, incluindo as proteínas antitrombina (AT), proteínas C e S (59), que diminuem ainda mais em CVO. O dímero-D, produto de degradação do coágulo de fibrina, é um fragmento amplamente utilizado como biomarcador para coagulação intravascular disseminada e no diagnóstico e monitoramento de tromboembolismo venoso (60).

1.4. **Uso de hidroxiureia para tratamento da AF**

A hidroxiureia (HU) foi o primeiro medicamento aprovado pelo *Food & Drug Administration* (FDA) em 1998 para tratamento de AF em adultos (61). Os principais benefícios da HU para o tratamento de AF são relacionados à sua capacidade de aumentar os níveis de HbF, que inibe a polimerização intracelular da HbS e evita o processo de falcização nos eritrócitos (62,63). A HU pode levar ao aumento dos níveis de HbF em cerca de 50% dos pacientes com AF. No entanto, todos os benefícios da terapia de HU na AF são multifatoriais e os seus possíveis

efeitos celulares e vasculares são representados na Figura 6 (61). A HU é um inibidor da ribonucleotídeo redutase e atua como um agente específico da fase S com inibição da síntese de DNA e eventual citotoxicidade celular (64).

A HU causa supressão citotóxica intermitente dos progenitores eritroides e sinalização do estresse celular, o que leva ao recrutamento de progenitores eritróides com o aumento de níveis de HbF. A HU também está envolvido na formação de radicais livres, quelação de ferro, ativação da guanilil ciclase solúvel e produção direta de NO (61,65,66). A HU tem efeitos citotóxicos que reduzem a produção de neutrófilos, reticulócitos e o número de plaquetas, que é um importante mediador da inflamação. Tanto os neutrófilos quanto os reticulócitos promovem a vasooclusão por adesão vascular; a HU reduz seus números absolutos e reduz a expressão da superfície dos receptores de adesão (67). Um efeito frequentemente observado no tratamento com HU é um VCM elevado, apesar da reticulocitose reduzida. Os eritrócitos periféricos sofrem inúmeras alterações morfológicas e fisiológicas durante o escalonamento da dose de HU para a dose máxima tolerada, incluindo macrocitose, aumento da HCM, melhor hidratação, menos hemólise. O fluxo sanguíneo é melhorado, com uma concentração mais alta de hemoglobina e níveis mais baixos de LDH e bilirrubina (64).

Os cenários clínicos para os quais a terapia com HU é recomendada são: duas ou mais CVOs / ano que requerem tratamento e hospitalizações, anemia grave ($Hb < 7g/dL$) histórico de STA, sequestro esplênico, hospitalizações frequentes (68). No entanto, aproximadamente 30% dos pacientes não respondem à terapia com HU (62). No entanto, outros mecanismos provavelmente também são responsáveis por produzir benefícios, uma vez que alguns pacientes com terapia com HU melhoram clinicamente sem aumento do nível da HbF (58,59)

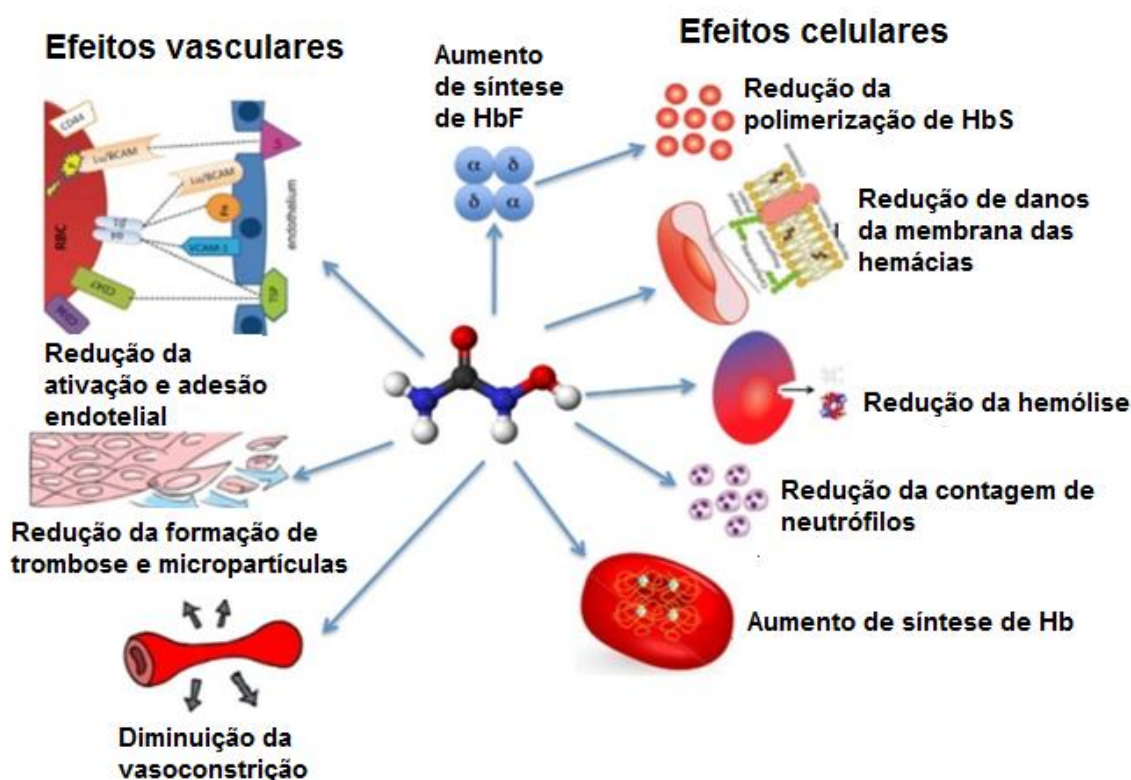


Figura 6: Múltiplos efeitos da administração de HU em pacientes com doença falciforme. Adaptada de Verma et al.,2018 (61)

2. JUSTIFICATIVA

A AF é uma doença hereditária grave e representa um problema de saúde pública no Brasil. Apesar de ter uma base genética e fisiopatologia comum, os pacientes com AF têm um fenótipo clínico altamente variável. A eficácia da HU no tratamento da AF é geralmente atribuída à sua capacidade de aumentar a HbF. Porém, os mecanismos pelos quais isso ocorre não são claros e outros mecanismos podem ser responsáveis pelo benefício clínico desse medicamento (69). Portanto, a avaliação de marcadores de hemólise, de disfunção endotelial e do estado de hipercoagulabilidade em pacientes com AF com e sem terapia com HU pode contribuir para o melhor entendimento dos papéis dessas proteínas na fisiopatologia da doença.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a associação entre marcadores de hemólise intravascular, de disfunção endotelial e do estado de hipercoagulabilidade em pacientes brasileiros com AF com e sem uso de HU.

3.2. Objetivos específicos

- ❖ Quantificar os marcadores de hemólise intravascular, disfunção endotelial e hipercoagulabilidade nos pacientes com AF (com e sem terapia com HU) e em controles HbAA:
 - **Os marcadores de hemólise intravascular:** lactato desidrogenase (LDH) sérica, contagem de reticulócitos, heme total sérica, Hb plasmática (pHb) e CD163 solúvel (sCD163);
 - **Os marcadores de disfunção endotelial :** Antígeno de fator de von Willebrand (FvW:Ag), atividade de cofator de ristocetina de FvW (FvW:RCo), antígeno da ADAMTS13 (ADAMTS13: Ag), Atividade da enzima ADAMTS13 (ADAMTS13: Act), trombospondina-1 (TSP1) e endotelina-1 (ET-1);
 - **Os marcadores de hipercoagulabilidade:** dímero-D, fibrinogênio e complexo trombina-antitrombina (TAT).
- ❖ Comparar essas variáveis entre os pacientes com AF (com e sem terapia com HU) e com os controles HbAA;
- ❖ Correlacionar os marcadores de hemólise intravascular, de disfunção endotelial e de hipercoagulabilidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Casuística

O estudo transversal analítico incluiu cinquenta e cinco pacientes adultos com AF (n=55) atendidos no Ambulatório de Hemoglobinopatias do Hemocentro de Pernambuco–HEMOPE, em Recife/PE, com idade entre 18-55 anos. Eles foram divididos em dois grupos: 30 pacientes não tratados com HU (HbSS) e 25 pacientes em terapia com HU (HbSS_HU). Além disso, um grupo controle de trinta e dois (n=32) adultos, estudantes universitários saudáveis sem doenças hematológicas e livres de qualquer tratamento médico (HbAA), afrodescendentes e da mesma região geográfica, foram incluídos no estudo. Os pacientes HbSS foram convocados no período de 31 de janeiro a 23 de fevereiro de 2017; e os pacientes HbSS_HU e controles foram convocados no período de 19 de julho a 30 de agosto de 2017.

Todos os pacientes encontravam-se em fase estável da doença, ou seja, na ausência de hospitalização e transfusão sanguínea no período de três (3) meses anteriores à data da coleta das amostras, sem dor, sem sinais ou sintomas de infecção e outros episódios agudos sugestivos de crise. Os critérios de exclusão foram indivíduos com doença inflamatória aguda/crônica ou com infecções e mulheres grávidas.

4.2. Aspectos Éticos da Pesquisa

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) para Estudos em Seres Humanos da Universidade Estadual de Campinas com o parecer nº 1.703.176 (Anexo 1) e pelo CEP do HEMOPE com o parecer nº 1.863.428 (Anexo 2) de acordo com os princípios éticos descritos na Declaração de Helsinque 1964 e com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde - 466/12. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pelo CEP (Anexo 3).

4.3. Separação das amostras

A separação das amostras dos pacientes foi realizada no Laboratório de Hemoglobinopatias do HEMOPE. As amostras de sangue dos 55 pacientes e 32

controles foram coletadas em tubos contendo EDTA e citrato de sódio, como anticoagulantes, e em tubos sem anticoagulante.

O plasma e o soro foram obtidos após centrifugação de acordo com a exigência para cada tipo de material. Todas as alíquotas foram armazenadas em freezer -80°C no Laboratório Central da UFPE (Recife) até o momento de transporte para o Laboratório de Hemoglobinopatias da FCM/Unicamp (Campinas), onde foram realizadas as dosagens dos marcadores estudados.

➤ **Separação do plasma em EDTA**

As amostras foram coletadas em tubo (4,0 mL) contendo EDTA como anticoagulante, centrifugadas por 15 minutos a 1000g e 4°C, aliquotadas e armazenadas em freezer -80°C até a realização dos ensaios.

➤ **Separação do plasma em citrato**

As amostras foram coletadas em tubo (4,0 mL) contendo citrato de sódio como anticoagulante, centrifugadas por 20 minutos a 3000 rpm e 4°C, aliquotadas e armazenadas em freezer -80°C até a realização dos ensaios.

➤ **Separação do soro**

As amostras foram coletadas em tubo seco (9,0 mL), sem anticoagulante, centrifugadas a 1000g por 15 minutos e 4°C, aliquotadas e armazenadas em freezer -80°C até a realização dos ensaios.

4.4. Análises hematológicas e coleta dos dados clínicos

A quantificação das hemoglobinas foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC – Variant II™/ Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Os índices hematimétricos e a contagem dos reticulócitos foram obtidos com a utilização de contador automático de células STKS (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA). Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos dos prontuários médicos.

4.5. Determinação das concentrações plasmáticas ou séricas dos marcadores de hemólise intravascular

Como marcadores de hemólise intravascular, a LDH, a pHb, o heme total sérico e o sCD163 foram quantificados. A LDH foi quantificada utilizando-se o equipamento Cobas C501 analyzer (Roche Diagnostics, Meylan, France), enquanto que a concentração de pHb, do heme total e sCD163 foram determinados utilizando os kits comerciais: Human Hemoglobin ELISA Kit ab157707 (Abcam; Cambridge, UK), Quantichrome haem assay (BioAssay Systems) e Human sCD163 Quantikine (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante.

4.6. Determinação das concentrações plasmáticas dos marcadores de disfunção endotelial

Os níveis plasmáticos de FvW:Ag e FvW:RCo foram avaliados pelo método imunoturbidimetria utilizando os Kits para FvW:Ag (Hemosil von Willebrand Factor Antigen, Werfen) e FvW:RCo (Hemosil VWF:RCo, Werfen), respectivamente, no equipamento ACL TOP 500 CTS Device (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, EUA).

A avaliação da ADAMTS13:Act foi realizada pelo método FRETs (*Fluorescence Resonance Energy Transfer Substrate*) utilizando o kit comercial ACTIFLUOR™ ADAMTS13 activity assay (Sekisui Diagnostics, LLC., Stamford, CT, EUA). Enquanto que os níveis circulantes do ADAMTS13:Ag no plasma foram avaliados pelo kit comercial de ELISA Imubind ADAMTS13 (Sekisui Diagnostics, LLC., Stamford, CT, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

As concentrações séricas da ET-1 e da TSP1 foram determinadas nas amostras dos pacientes e controles, por kits comerciais de ELISA (*Endothelin-1 Quantikine* e *Human Thrombospondin-1 Quantikine*, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.7. Determinação das concentrações plasmáticas dos marcadores de hipercoagulabilidade

O complexo TAT foi mensurado por ensaio comercial *Human Thrombin-Antithrombin Complex ELISA Kit ab108907* (Abcam; Cambridge, UK). Por outro lado, as dosagens de fibrinogênio e dímero-D foram realizadas por método imunoturbidimétrico utilizando ensaio “*Dade Thrombin Reagent Multifibren® U*” e “*Innovance D-DIMER*”, respectivamente, no equipamento Sysmex® CA-1500.

4.8. Análise estatística

As variáveis quantitativas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil (IQR). As variáveis qualitativas foram apresentadas como números e proporções (%) e o teste Qui-quadrado foi utilizado para compará-los. Para comparação das variáveis quantitativas foram utilizadas os testes não paramétricos de Mann-whitney entre 2 grupos e Kruskal-wallis entre 3 grupos. Para as análises de correlações, as variáveis foram transformadas em logaritmo base de 2, para corrigir os vieses da diferença de escala entre as variáveis. As correlações entre os diferentes marcadores foram avaliadas utilizando o coeficiente de correlação de Spearman. O valor considerado estatisticamente significativo para os testes foi de 5%.

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa estatístico R (versão 3.2.3; disponível no site <http://www.r-project.org>) e *software Prism 7* (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 Características demográficas e hematológicas dos controles HbAA e pacientes HbSS_HU e HbSS

Oitenta e sete (87) adultos foram incluídos no estudo. A idade mediana dos 30 pacientes HbSS (31 anos) e 25 pacientes HbSS_HU (27,5 anos) foi maior que a dos 32 controles HbAA (21,5 anos). Não houve diferença em relação a distribuição do gênero entre os três grupos. Como esperado, a contagem dos eritrócitos, hematócrito e Hb foram significativamente maiores nos controles HbAA do que em pacientes HbSS_HU e HbSS ($p < 0,0001$ para cada comparação). Os níveis de CHCM, RDW, leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas foram significativamente maiores em pacientes HbSS e pacientes HbSS_HU do que nos controles HbAA. Houve um aumento significativo de VCM, hematócrito e Hb em pacientes HbSS_HU quando comparados aos pacientes HbSS. As características demográficas e hematológicas estão resumidos na Tabela 1. Em relação aos níveis de HbF, foi observado um aumento significativo nos pacientes HbSS_HU (durante tratamento) quando comparados aos pacientes HbSS (Figura 7A). Além disso, os níveis de HbF foram significativamente maiores nos pacientes HbSS_HU durante o período de tratamento quando comparado ao período antes de tratamento (Figura 7B). A duração de tratamento dos pacientes HbSS_HU com HU variou de 1 a 18 anos e com dose de 500mg/dia a 1,5g/dia.

Tabela 1: Características demográficas e hematológicas dos controles HbAA e pacientes HbSS_HU e HbSS

Variáveis	HbAA (A) n=32 Mediana (IIQ)	HbSS_HU (B) n=25 Mediana (IIQ)	HbSS (C) n=30 Mediana (IIQ)	p-valor			
				A vs B	A vs C	B vs C	
Gênero	15 /17	17/8	21/9	0,12*	0,11	0,06	0,87
M/F							
Idade	21,50 (20 -23)	27,5 (25,25 – 33,5)	31 (25- 39,25)	<0,0001 [#]	<0,0001	<0,0001	0,49
RBC× 10⁶	5,085 (4,18 – 5,81)	2,48 (2,15 – 2,66)	2,3 (1,95 – 2,59)	<0,0001 [#]	<0,0001	<0,0001	0,32
Hemoglobina, g/dL	14,4 (13,48 – 16,48)	8,2 (7,45 - 9,45)	7,0 (6,5 – 7,87)	<0,0001 [#]	<0,0001	<0,0001	0,0016
Hematócrito , %	42,45 (45,90 – 49,28)	23,60 (20,75 – 26,25)	19,75 (18,18 -22,43)	<0,0001 [#]	<0,0001	<0,0001	0,0024
VCM, fl	88,10 (84,38 - 91,25)	97,4 (87,05 – 102,9)	88,4 (81,38 – 93,7)	0,0056 [#]	0,0024	0,713	0,0083
HCM , pg	29,25 (27,65 - 30,40)	35,20 (31,20 - 37,95)	31,85 (29,93 - 33,40)	<0,0001 [#]	<0,0001	0,0011	0,0014
CHCM , g/dL	33,15 (32,40 - 33,98)	36,20 (35,50 - 36,95)	35,80 (34,85 - 36,60)	<0,0001 [#]	<0,0001	<0,0001	0,096
RDW,%	12,65 (11,75 - 13,10)	19,90 (17,50 - 23,20)	20,90 (19,78 - 22,43)	<0,0001 [#]	<0,0001	<0,0001	0,0243
Leucócitos×10³/μL	7,84 (6,06 – 9,235)	9,67 (7,595 – 11,09)	10,83 (8,01 – 13,588)	<0,0001 [#]	0,0016	<0,0001	0,176
Neutrófilos×10³/μL	4,15 (2,850 – 4,995)	5,063 (3,518 – 6,674)	5,49 (3,151 – 8,006)	0,023 [#]	0,035	0,011	0,581
Linfócitos×10³/μL	2,31 (1,848 – 2,68)	2,856 (2,199 - 3,839)	3,112 (2,748 - 4,374)	<0,0001 [#]	0,0031	<0,0001	0,171
Monócitos×10³/μL	0,512 (0,453 - 0,64,8)	0,98 (0,743 - 1,263)	1,124 (0,873 - 1,548)	<0,0001 [#]	<0,0001	<0,0001	0,16
Plaquetas×10³/μL	259,5 (215 - 303,75)	353 (274 – 437)	449,5 (287,75 -523,75)	<0,0001 [#]	0,0005	<0,0001	0,087

RBC: contagem dos eritrócitos, VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, RDW: Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos, IIQ: intervalo interquartil, A: HbAA, B: HbSS_HU, C: HbSS. * Pearson's χ^2 test, [#] p-valor baseado em teste de Kruskal-Wallis. p-valor baseado em teste de "Mann-whitney" foi usado para comparação das variáveis quantitativas entre 2 grupos.

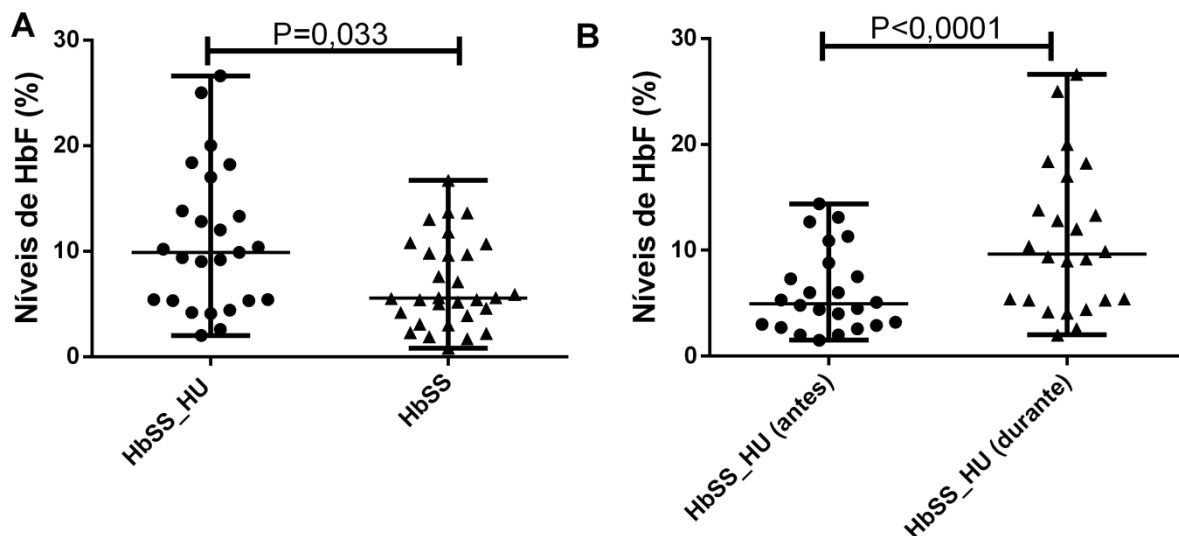


Figura 7: Os níveis de hemoglobina fetal (HbF) nos pacientes. A: Níveis de HbF em pacientes com AF com terapia com HU [HbSS_HU] durante o tratamento e nos pacientes com AF sem terapia com HU [HbSS]; o p-valor foi obtido usando o teste não paramétrico “Mann-whitney”. B: Níveis de HbF em pacientes HbSS_HU antes de tratamento e durante o tratamento; o p-valor foi obtido usando o teste não paramétrico “Wilcoxon”.

5.2 Complicações clínicas dos pacientes HbSS_HU e HbSS

A prevalência das complicações clínicas foi resumida na Tabela 2. Entre os pacientes HbSS_HU foi observada uma redução dos eventos de colelitíase e úlcera de perna quando comparados aos pacientes HbSS. Porém, não foi observada diferença significativa entre as ocorrências das complicações tais como osteonecrose, cardiopatia, priapismo e CVO.

Tabela 2: Frequências das complicações clínicas em pacientes HbSS_HU e HbSS

	HbSS_HU (n=25)	HbSS (n=30)	p-valor
Úlcera de perna	3 (12%)	15 (50%)	0,002
Osteonecrose	5 (20%)	8 (26,67%)	0,56
Cardiopatía	2 (8%)	5 (16,67%)	0,33
Colelitíase	5 (20%)	20 (66,67%)	0,0005
Priapismo	3 (17,65%) ^{\$}	6 (28,57%) [#]	0,43
Crise vaso-oclusiva			
0	5(20%)	1 (3,33%)	0,07
<3	13 (52%)	14 (46,67%)	
>3	7(28%)	15 (50%)	

Os valores de p-valor foram obtidos usando o teste de χ^2 ; \$: n para o cálculo é 17; #: n para o cálculo é 21

5.3 Marcadores de hemólise intravascular em controles e pacientes

Foi observada uma diminuição dos níveis da LDH e pHb nos pacientes HbSS_HU quando comparados aos pacientes HbSS (Figura 8A-B, Tabela 3). A contagem de reticulócitos não foi significativamente diferente entre os pacientes HbSS_HU e HbSS (Figura 8C, Tabela 3). Em relação aos níveis de sCD163, foi observada uma diminuição significativa nos pacientes HbSS e HbSS_HU quando comparados aos controles HbAA (Figura 8D, Tabela 3), enquanto os níveis de heme total foram significativamente maiores no grupo HbSS e HbSS_HU do que nos controles HbAA (Figura 8E, Tabela 3). Porém, os níveis de sCD163 e heme total não foram significativamente diferentes entre os grupos HbSS_HU e HbSS.

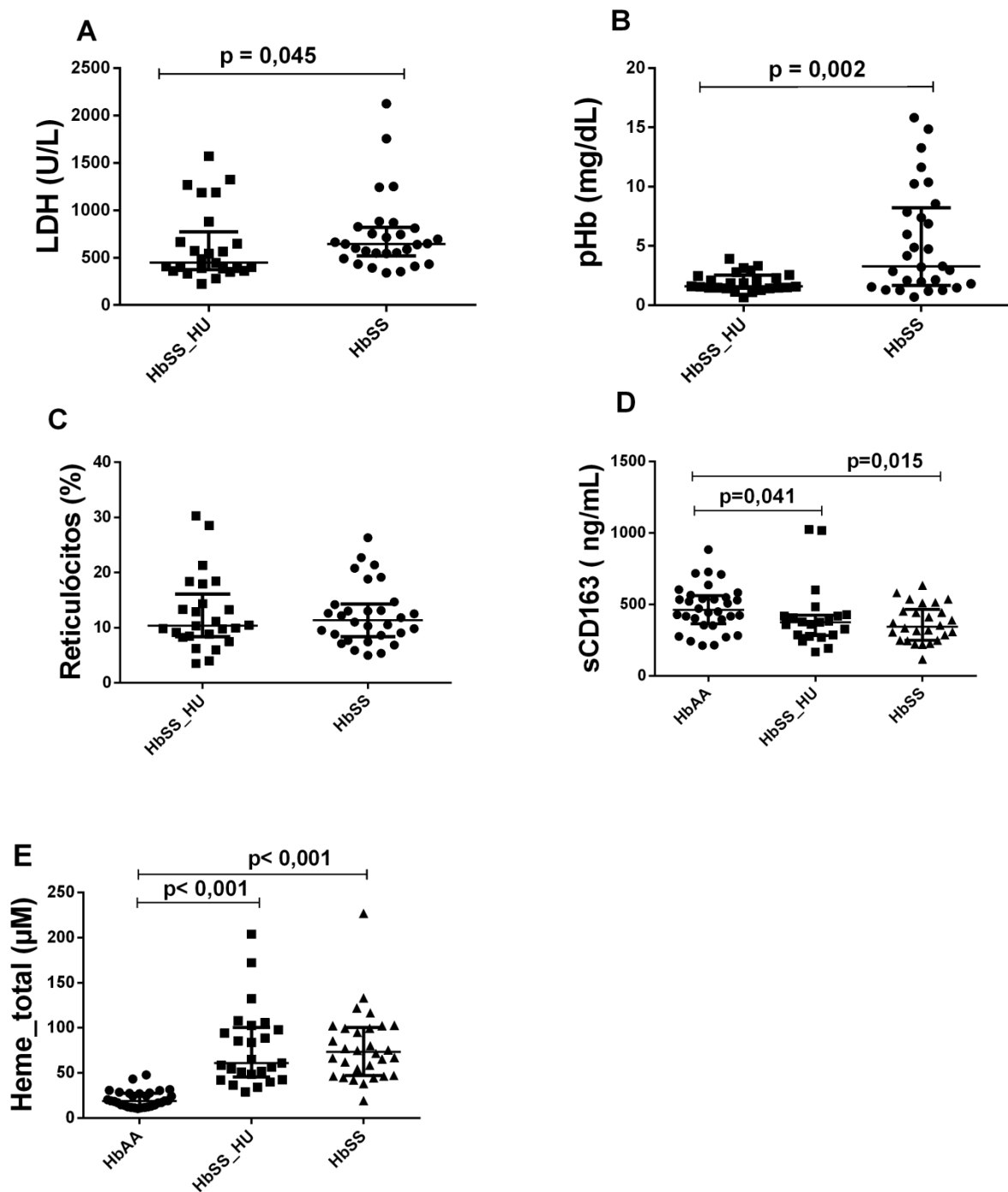


Figura 8: Os marcadores de HI. (A) os níveis de lactato desidrogenase (LDH) em pacientes com AF com terapia com HU [HbSS_HU] e sem terapia com HU [HbSS]. (B) os níveis de hemoglobina plasmática (pHb) em pacientes HbSS_HU e HbSS. (C) a contagem de reticulócitos em pacientes HbSS_HU e HbSS. (D) os níveis de CD163 solúvel em controles HbAA, em pacientes HbSS_HU e HbSS. (E) os níveis de heme total em controles HbAA, em pacientes HbSS_HU e HbSS. Os valores de p foram obtidos usando o teste não paramétrico “Mann-whitney”.

Tabela 3: Marcadores de HI em pacientes HbSS_HU, HbSS e em controles HbAA

Marcadores	HbAA (A) n=32 Mediana (IIQ)	HbSS_HU (B) n=25 Mediana (IIQ)	HbSS (C) n=30 Mediana (IIQ)	p-valor			
				A vs B	A vs C	B vs C	
LDH (U/L)	-	446 (374,5 - 773)	644 (517,5 - 819)	NA	NA	NA	0,045 [*]
pHb (mg/dL)	-	1,58 (1,45 – 2,52)	3,29 (1,68 – 8,21)	NA	NA	NA	0,002 [*]
Reticulócitos (%)	-	10,34 (8,35 – 16,13)	11,4 (8,39 -14,33)	NA	NA	NA	0,86 [*]
sCD163 (ng/mL)	460,0 (364,5 – 560,7)	375,3 (281,5 – 422,7)	344,3 (248,1 – 465,9)	0,028 [#]	0,041 [*]	0,015 [*]	0,803 [*]
Heme_total (μ M)	19,07 (13,22 – 27,31)	60,88 (45,61 – 100,3)	73,28 (47,07 – 100,2)	<0,0001 [#]	<0,0001 [*]	<0,0001 [*]	0,616 [*]

IIQ: intervalo interquartil. ^{*} *p*-valor baseado em teste de “Mann-whitney”, [#] *p*-valor baseado em teste de “Kruskal-Wallis. NA: não se aplica

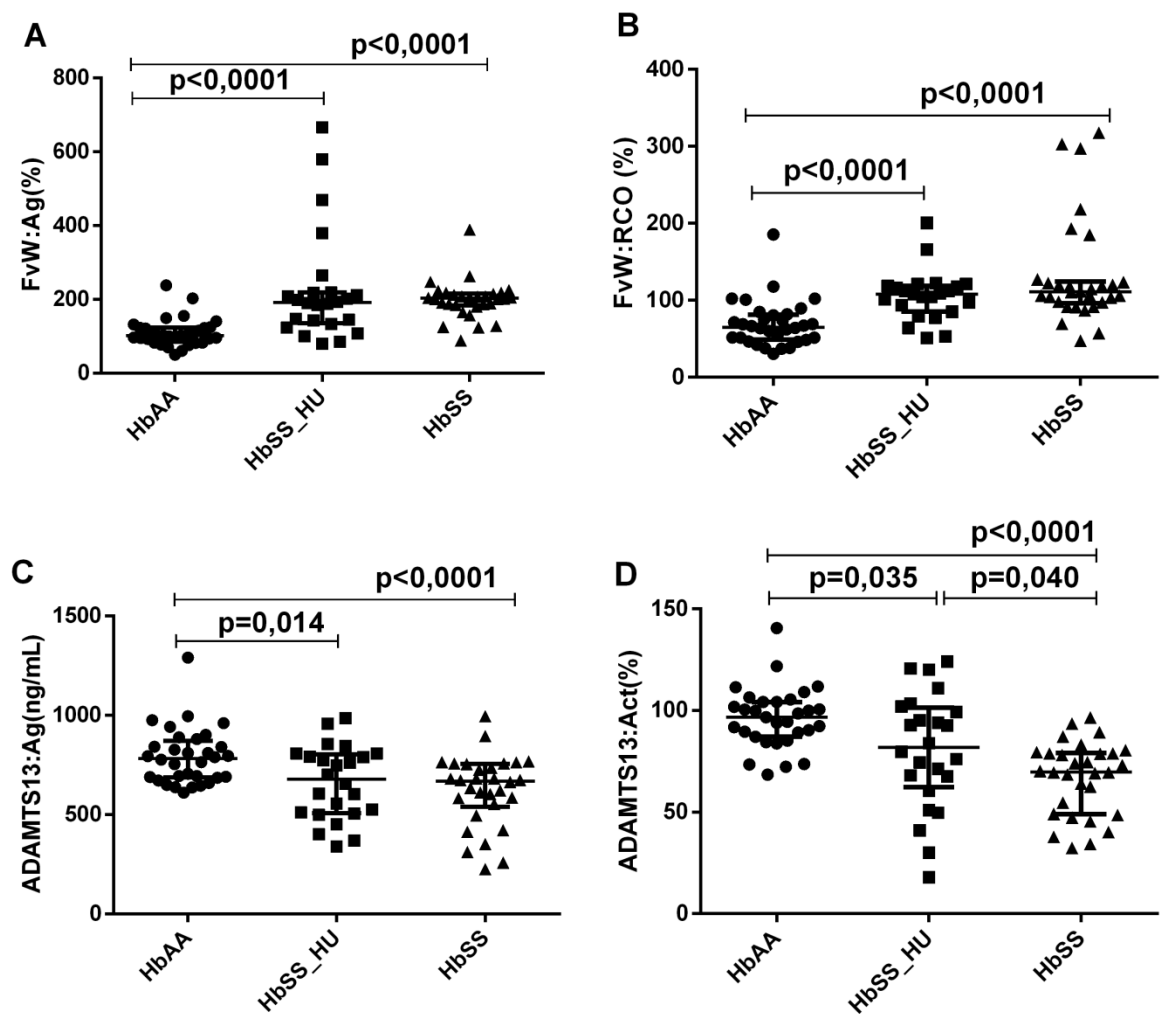
5.4 Marcadores de disfunção endotelial em controles e pacientes

As Figuras 9A-F e Tabela 4 mostram os níveis de marcadores de disfunção endotelial: FvW:Ag, FvW:RCo, ADAMTS13:Ag, ADAMTS13:Act, TSP-1 e ET-1 em controles HbAA, pacientes HbSS_HU e HbSS. Foi observado um aumento de níveis de FvW:Ag e FvW:RCo em pacientes HbSS_HU e HbSS quando comparados aos dos controles HbAA (Figuras 9A-B e Tabela 4). Mas tanto os níveis de FvW:Ag quanto níveis de FvW:RCo não foram significativamente diferentes entre os pacientes HbSS_HU e HbSS.

Além disso, a dosagem plasmática de ADAMTS13:Ag e ADAMTS13:Act estava diminuída no grupo HbSS_HU e HbSS em relação ao grupo controle HbAA (Figuras 9C-D e Tabela 4). Os níveis de ADAMTS13:Act estava aumentado em pacientes HbSS_HU quando comparados aos de pacientes HbSS (Figura 9D e Tabela 4). Entretanto, não houve diferença entre esses dois grupos em relação aos níveis de ADAMTS13:Ag.

Também foi observado um aumento dos níveis de trombospondina-1 e endotelina-1 em pacientes HbSS_HU e HbSS quando comparados aos dos

controles HbAA (Figuras 9E-F e Tabela 4). Houve um aumento significativo dos níveis da trombospondina-1 em pacientes HbSS em comparação aos pacientes HbSS_HU (Figura 9E e Tabela 4). No entanto, não foi observada diferença significativa entre esses dois grupos em relação aos níveis de endotelina-1 (Figura 9F e Tabela 4).



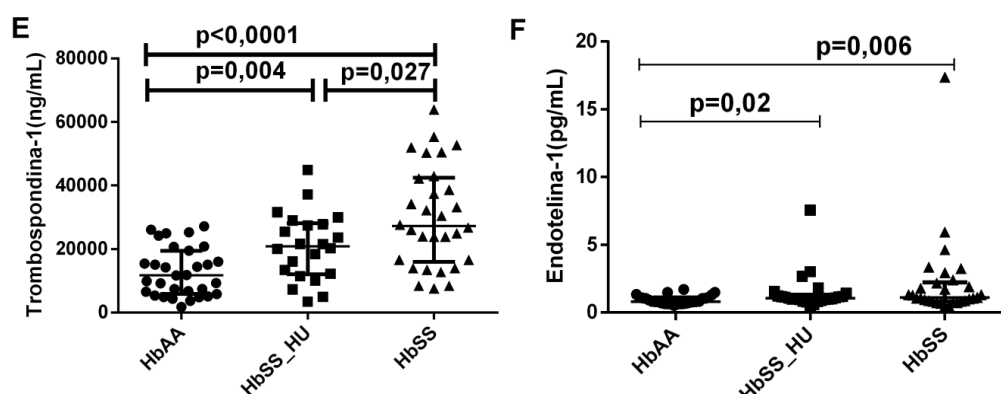


Figura 9: Os marcadores de DE. (A) os níveis de antígeno de fator de von Willebrand (FvW:Ag) em controles HbAA, em pacientes com AF e terapia com HU [HbSS_HU] e sem terapia com HU [HbSS]. (B) os níveis da atividade de fator de von Willebrand (FvW:RCo) em controles HbAA, em pacientes HbSS_HU e HbSS. (C) os níveis do antígeno de ADAMTS13 (ADAMTS13:Ag) em controles HbAA, em pacientes HbSS_HU e HbSS. (D) os níveis da atividade de ADAMTS13 (ADAMTS13:Act) em controles HbAA, em pacientes HbSS_HU e HbSS. (E) os níveis da trombospondina-1 em controles HbAA, em pacientes HbSS_HU e HbSS. (F) os níveis da endotelina-1 em controles HbAA, em pacientes HbSS_HU e HbSS. Os valores de p foram obtidos usando o teste não paramétrico “Mann-whitney”.

Tabela 4: Marcadores de DE em controles HbAA e em pacientes HbSS_HU e HbSS

Marcadores	HbAA (A) n=32 Mediana (IIQ)	HbSS_HU (B) n=25 Mediana (IIQ)	HbSS (C) n=30 Mediana(IIQ)	p- valor			
				A vs B	A vs C	B vs C	
FvW:Ag (%)	102,7 (85,5 - 123,4)	192 (136 -218,9)	203,4 (184,1 -215,8)	<0,0001 [#]	<0,0001 [*]	<0,0001 [*]	0,547 [*]
FvW:RCo (%)	65,2 (49,15 - 81,43)	107,9 (85,3 - 118,5)	111,3 (96,08 - 124,5)	<0,0001 [#]	<0,0001 [*]	<0,0001 [*]	0,263 [*]
ADAMTS13:Ag (ng/mL)	782,6 (686,9 - 871,2)	677,8 (506,6 - 803,5)	668,9 (539 - 755,1)	0,0007 [#]	0,014 [*]	<0,0001 [*]	0,389 [*]
ADAMTS13:Act (%)	96,63 (87,01 - 104,2)	81,83 (62,27 - 101,3)	69,87 (48,91 - 79,09)	<0,0001 [#]	0,035 [*]	<0,0001 [*]	0,04 [*]
TSP-1(ng/mL)	11682 (5835 -19530)	20932 (12033 - 28164)	27217 (15958 - 42420)	<0,0001 [#]	0,0041 [*]	<0,0001 [*]	0,027 [*]
ET-1(pg/mL)	0,815 (0,67 - 1,115)	1,06 (0,925 - 1,325)	1,1 (0,84 - 2,23)	0,013 [#]	0,02 [*]	0,006 [*]	0,582 [*]

IIQ: intervalo interquartil. [#] p-valor baseado em teste de “Kruskal-Wallis”. ^{*} p-valor baseado em teste de “Mann-whitney”.

5.5 Marcadores de hipercoagulabilidade em controles e pacientes

As Figuras 10A-C e Tabela 5 mostram os níveis de marcadores de hipercoagulabilidade: dímero-D, trombina-antitrombina (TAT) e fibrinogênio em controles HbAA, em pacientes HbSS_HU e HbSS.

Houve um aumento significativo de níveis de dímero-D e TAT em pacientes HbSS_HU e HbSS quando comparados aos dos controles HbAA (Figuras 10A-B e Tabela 5). Porém, os níveis de dímero-D e TAT não foram significativamente diferentes entre os grupos HbSS_HU e HbSS.

Em relação aos níveis de fibrinogênio, houve uma diminuição significativa desse marcador em pacientes HbSS quando comparados aos dos controles e pacientes HbSS_HU (Figura 10C e Tabela 5).

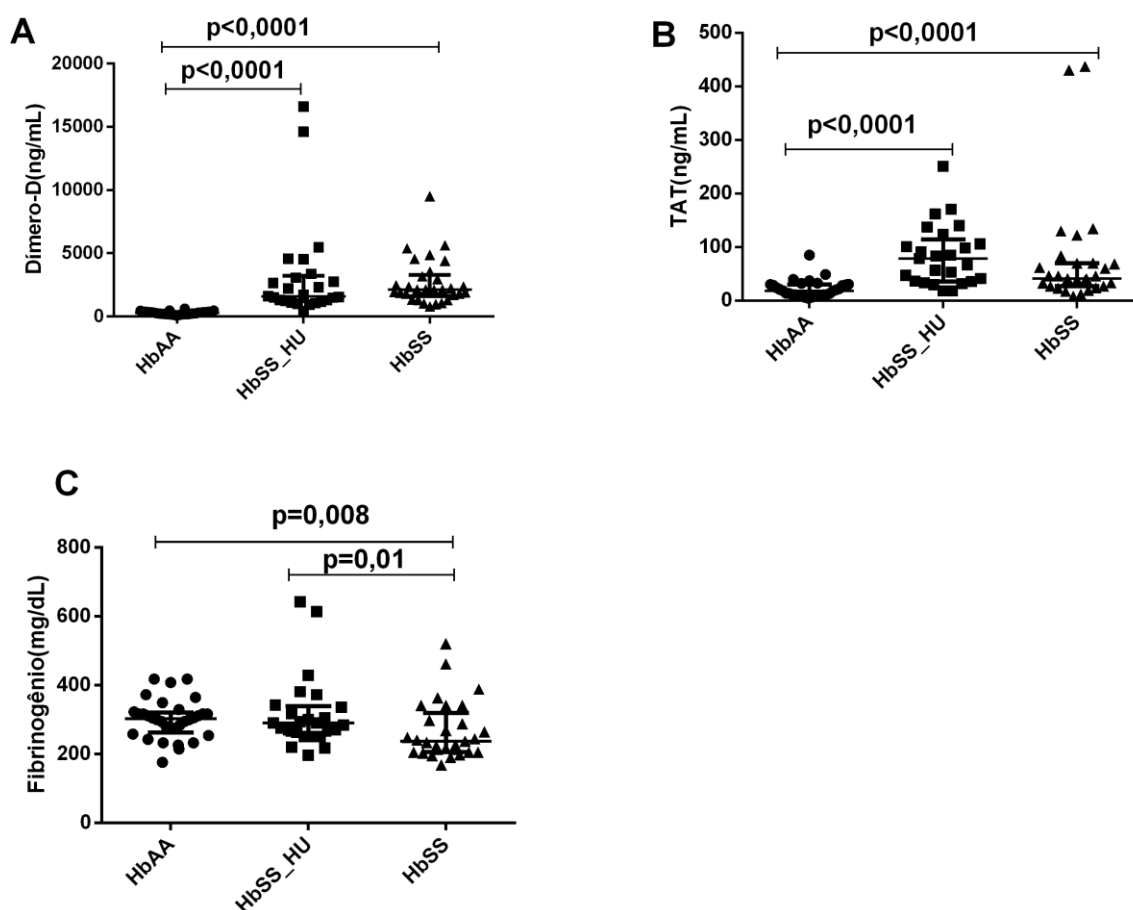


Figura 10: Os marcadores de hipercoagulabilidade. (A) os níveis de dímero-D em controles HbAA, em pacientes com AF e com terapia com HU [HbSS_HU] e sem terapia com HU [HbSS]. (B) Os níveis do complexo trombina- antitrombina em controles HbAA, em pacientes HbSS_HU e HbSS. (C) Os níveis fibrinogênio em controles HbAA, em pacientes HbSS_HU e HbSS. Os valores de p foram obtidos usando o teste não paramétrico “Mann-whitney”.

Tabela 5: Marcadores de hipercoagulabilidade em controles HbAA e em pacientes HbSS_HU e HbSS

Marcadores	HbAA (A)	HbSS_HU (B)	HbSS (C)	p- valor			
	n=32 Mediana (IIQ)	n=25 Mediana (IIQ)	n=30 Mediana(IIQ)		A vs B	A vs C	B vs C
Dímero-D (ng/mL)	267,5 (184,8 -365,8)	1600 (1201 – 3220)	2144 (1612 -3274)	<0,0001 [#]	<0,0001 [*]	<0,0001 [*]	0,394 [*]
TAT (ng/mL)	18,43 (10,78 – 30,1)	78,92 (36 -114,9)	41,16 (27,21 – 69,97)	<0,0001 [#]	<0,0001 [*]	<0,0001 [*]	0,068 [*]
Fibrinogênio (mg/dL)	302,3 (262 – 321,1)	289,5 (256,1 -339,1)	237 (205,3 – 319,3)	0,011 [#]	0,74 [*]	0,0083 [*]	0,010 [*]

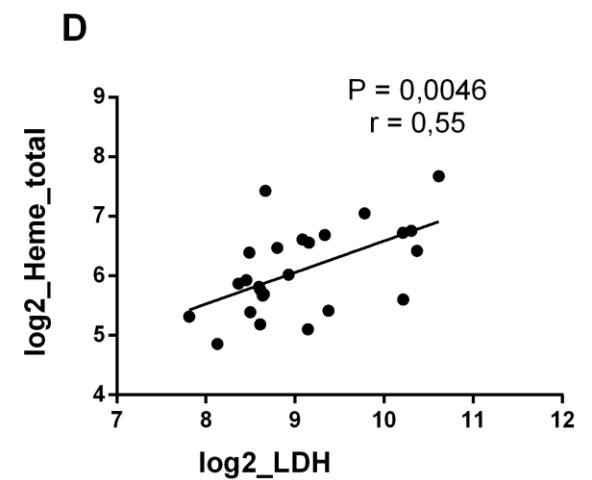
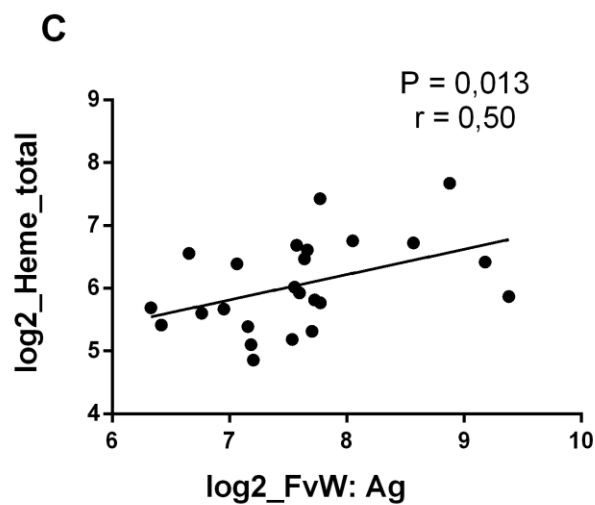
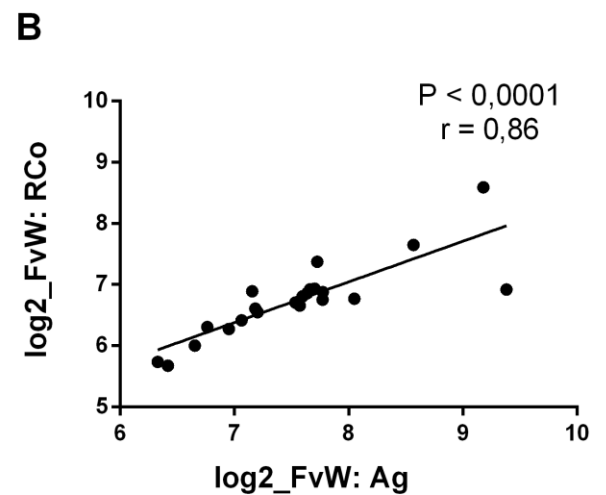
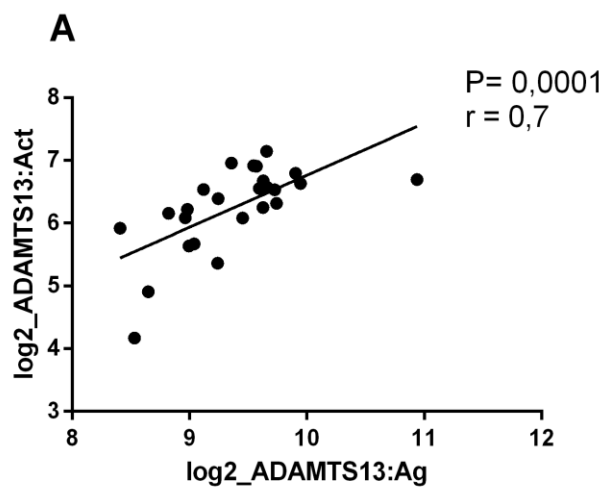
IIQ: intervalo interquartil. # p-valor baseado em teste de “Kruskal-Wallis. * p-valor baseado em teste de “Mann-whitney”.

5.6 Correlação entre os marcadores de hemólise intravascular e disfunção endotelial em pacientes com AF

As correlações entre os marcadores de HI e DE, no grupo HbSS_HU foram apresentadas na Figura 11 e Tabela 6. Foi encontrada correlação positiva forte entre os níveis de ADAMTS13:Ag e ADAMTS13:Act (Figura 11A e Tabela 6) e FvW:Ag e FvW:RCo (Figura 11B e Tabela 6). Houve correlação positiva moderada entre os níveis de FvW:Ag e heme_total (Figura 11C e Tabela 6) e LDH e heme_total (Figura 11D e Tabela 6). Além disso, foram observadas correlações negativas moderadas entre os níveis de ADAMTS13:Act e heme_total (Figura 11E e Tabela 6), LDH e HbF (Figura 11F e Tabela 6), ADAMTS13:Act e LDH (Figura 11G e Tabela 6) e FvW:Ag vs HbF (Figura 11H e Tabela 6).

Tabela 6: Correlação entre os marcadores de HI e DE em pacientes HbSS_HU

HbSS_HU	Log ₂ _ADAMTS13:Ag	Log ₂ _Heme_total	Log ₂ _LDH	Log ₂ _FvW:RCo	Log ₂ _HbF
	r(p)	r(p)	r(p)	r(p)	r(p)
Log ₂ _ADAMTS13:Act	0,70 (0,0001)	- 0,50 (0,013)	- 0,45 (0,026)	0,07 (0,75)	0,15 (0,46)
Log ₂ _FvW:Ag)	0,001 (0,99)	0,50 (0,012)	0,10 (0,63)	0,86 ($< 0,0001$)	-0,45 (0, 028)
Log ₂ _LDH	-0,12 (0,58)	0,55 (0,0046)		-0,08 (0,72)	-0,52 (0,007)



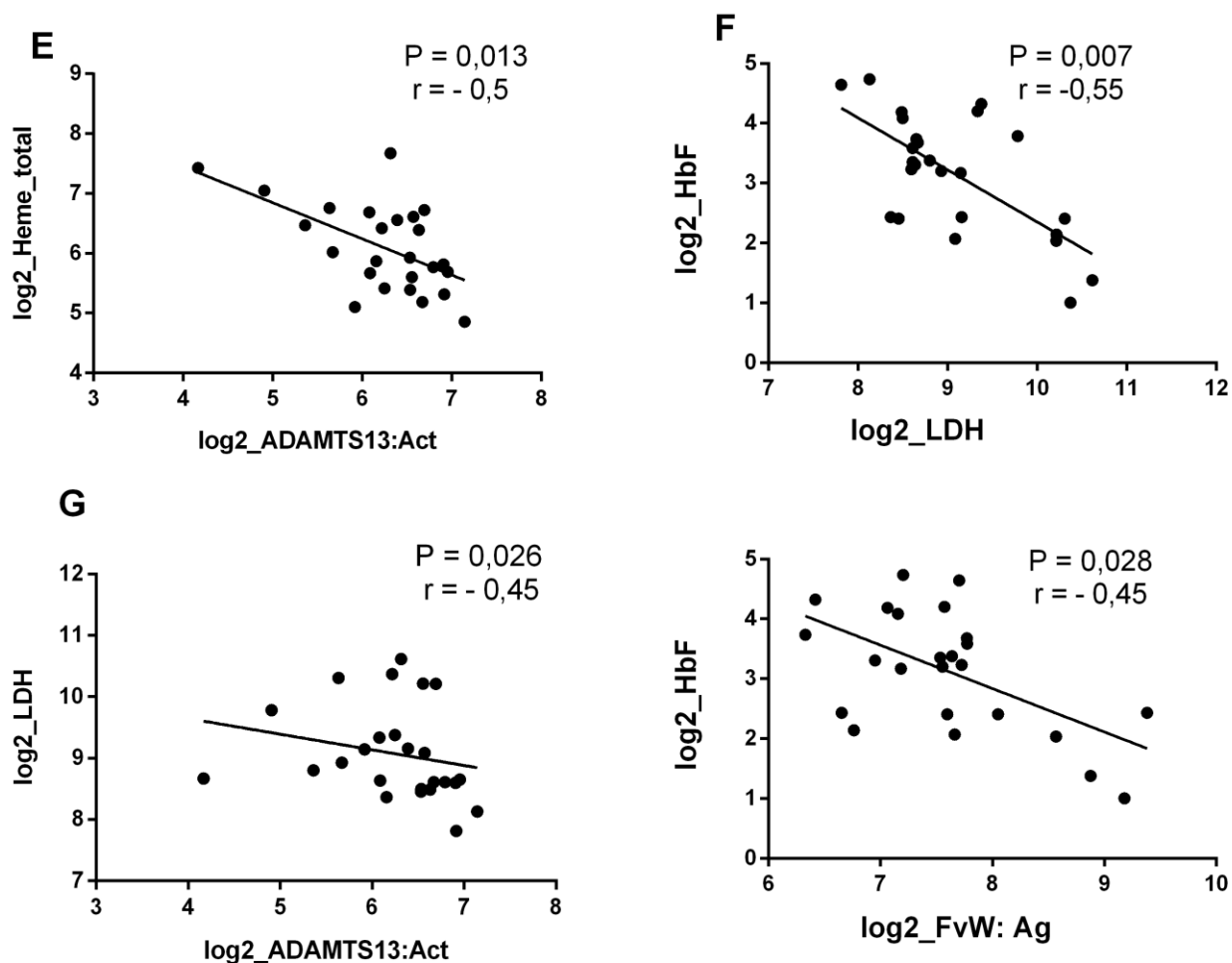
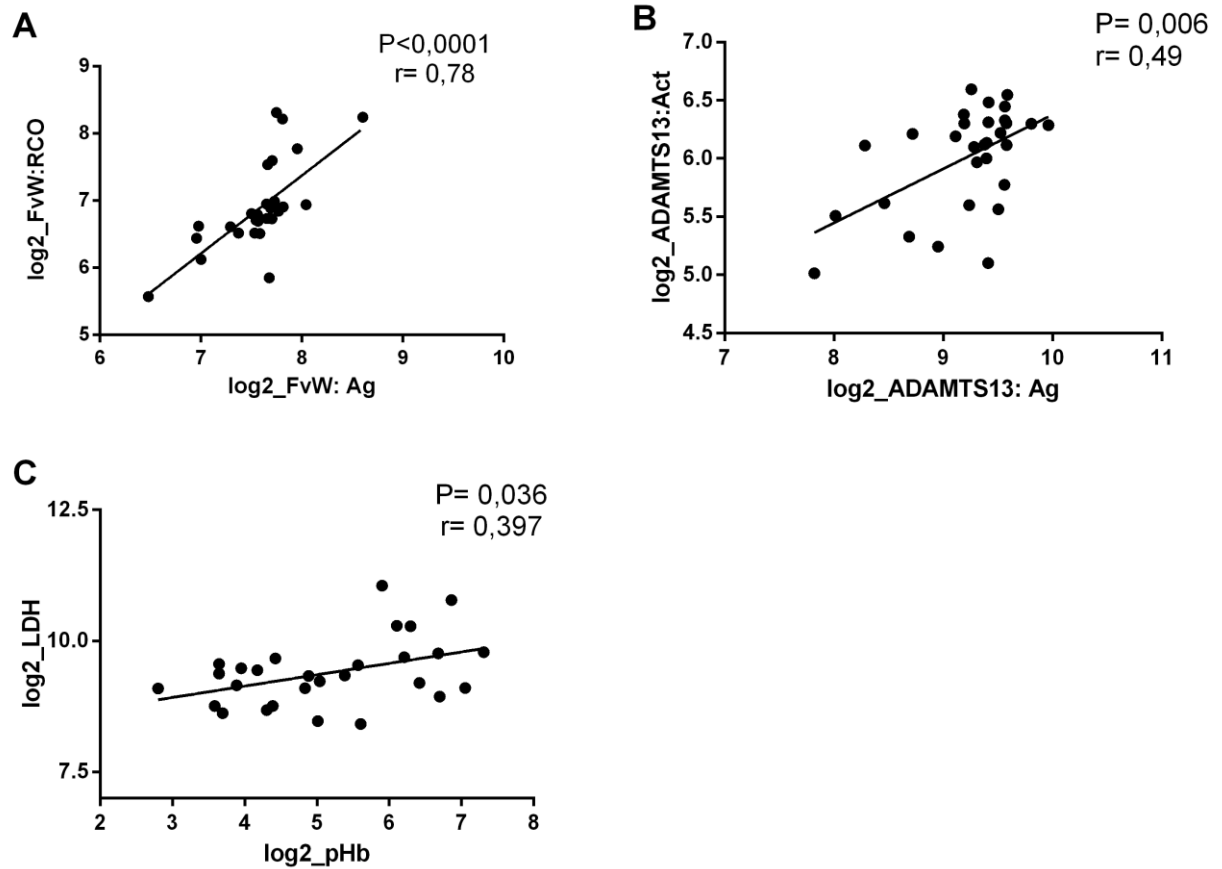


Figura 11: Correlação entre os marcadores de HI e DE em pacientes HbSS_HU. As variáveis foram transformadas em logaritmo de base 2. Os coeficientes de correlação r e os valores de p foram obtidos usando o teste não paramétrico “correlação de Spearman”.

No grupo HbSS, uma correlação positiva forte foi observada entre os níveis de FvW:Ag e FvW:RCo (Figura 12A e Tabela 7). Houve também uma correlação positiva moderada entre os níveis de ADAMTS13:Ag e ADAMTS13:Act (Figura 12B e Tabela 7) e uma correlação positiva fraca entre os níveis LDH e pHb (Figura 12C e Tabela 7).

Tabela 7: Correlação entre os marcadores de HI e DE em pacientes HbSS

HbSS	Log ₂ (ADAMTS13:Act) r(p)	Log ₂ (FvW:RCO) r(p)	Log ₂ (pHb) r(p)
Log ₂ (ADAMTS13:Ag)	0,49 (0,006)	0,212 (0,26)	0,166 (0,39)
Log ₂ (FvW:Ag)	0,241 (0,19)	0,78 (< 0,0001)	-0,236 (0,22)
Log ₂ (LDH)	-0,161 (0,41)	0,007 (0,97)	0,397 (0,036)

**Figura 12:** Correlação entre os marcadores de HI e DE em pacientes HbSS. As variáveis foram transformadas em logaritmo de base 2. Os coeficientes de correlação r e os valores de p foram obtidos usando o teste não paramétrico “correlação de Spearman”.

5.7 Correlação entre os marcadores de DE e hipercoagulabilidade em pacientes com AF

As correlações entre os marcadores de DE e de hipercoagulabilidade no grupo HbSS_HU constam na Figura 13 e na Tabela 8. Houve correlação positiva moderada entre os níveis de TSP-1 e plaquetas (Figura 13A e Tabela 8); dímero-D e FvW:Ag (Figura 13B e Tabela 8); dímero-D e FvW:RCO (Figura 13C e Tabela 8). Além disso, uma correlação negativa moderada foi observada entre os níveis de TAT e ADAMTS13:Act em pacientes HbSS_HU (Figura 13D e Tabela 8).

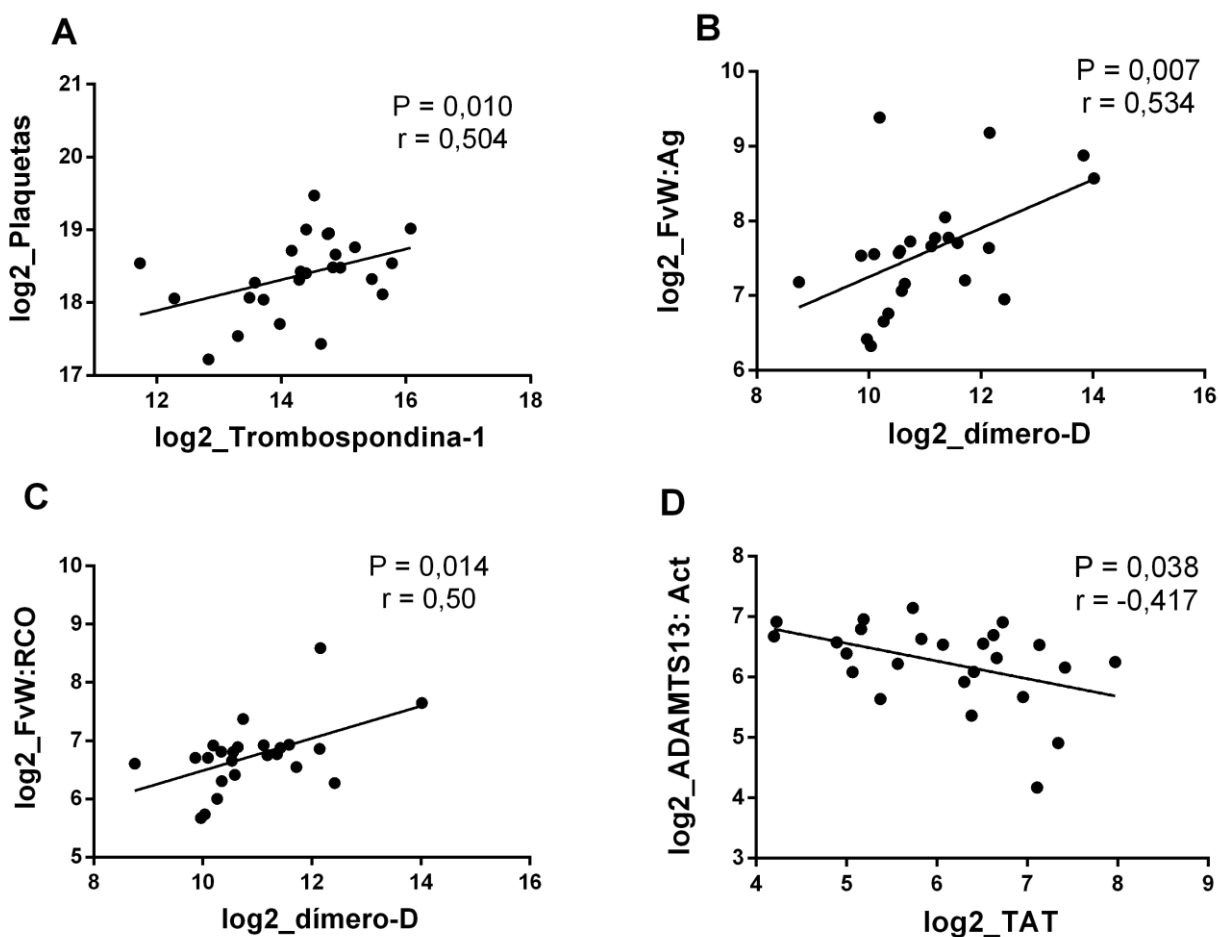


Figura 13: Correlação entre os marcadores de DE e de hipercoagulabilidade em pacientes HbSS_HU. As variáveis foram transformadas em logaritmo de base 2. Os coeficientes de correlação r e os valores de p foram obtidos usando o teste não paramétrico “correlação de Spearman”

Tabela 8: Correlação entre os marcadores de DE e de hipercoagulabilidade em pacientes HbSS_HU

HbSS_HU	Log ₂ _FvW:Ag r(p)	Log ₂ _FvW:RCo r(p)	Log ₂ _Plaquetas r(p)	log ₂ _TAT r(p)
Log ₂ _dímero-D	0,534 (0,007)	0,50 (0,014)	-0,289 (0,16)	-0,080 (0,70)
Log ₂ _ADAMTS13:Act	-0,16 (0,46)	0,07 (0,74)	-0,02 (0,91)	-0,417 (0,038)
Log ₂ _Trombospondina-1	0,02 (0,89)	-0,11 (0,61)	0,504 (0,010)	-0,25 (0,21)

No grupo HbSS foi observada uma correlação positiva moderada entre os níveis de dímero-D e FvW:Ag (Figura 14A e Tabela 9); e correlações fracas foram observadas entre os níveis de dímero-D e FvW:RCO (Figura 14B e Tabela 9) e TSP-1 e plaquetas (Figura 14C e Tabela 9).

Tabela 9: Correlação entre os marcadores de DE e de hipercoagulabilidade em pacientes HbSS

HbSS	FvW:Ag (%) r(p)	FvW:RCo (%) r(p)	Plaquetas (Celulas/mL) r(p)
Dímero-D (ng/mL)	0,475 (0,008)	0,38 (0,039)	-0,21 (0,26)
ADAMTS13:Act (%)	0,24 (0,19)	0,18 (0,34)	0,20 (0,29)
Trombospondina-1 (ng/mL)	-0,27 (0,14)	-0,26 (0,17)	0,37 (0,044)

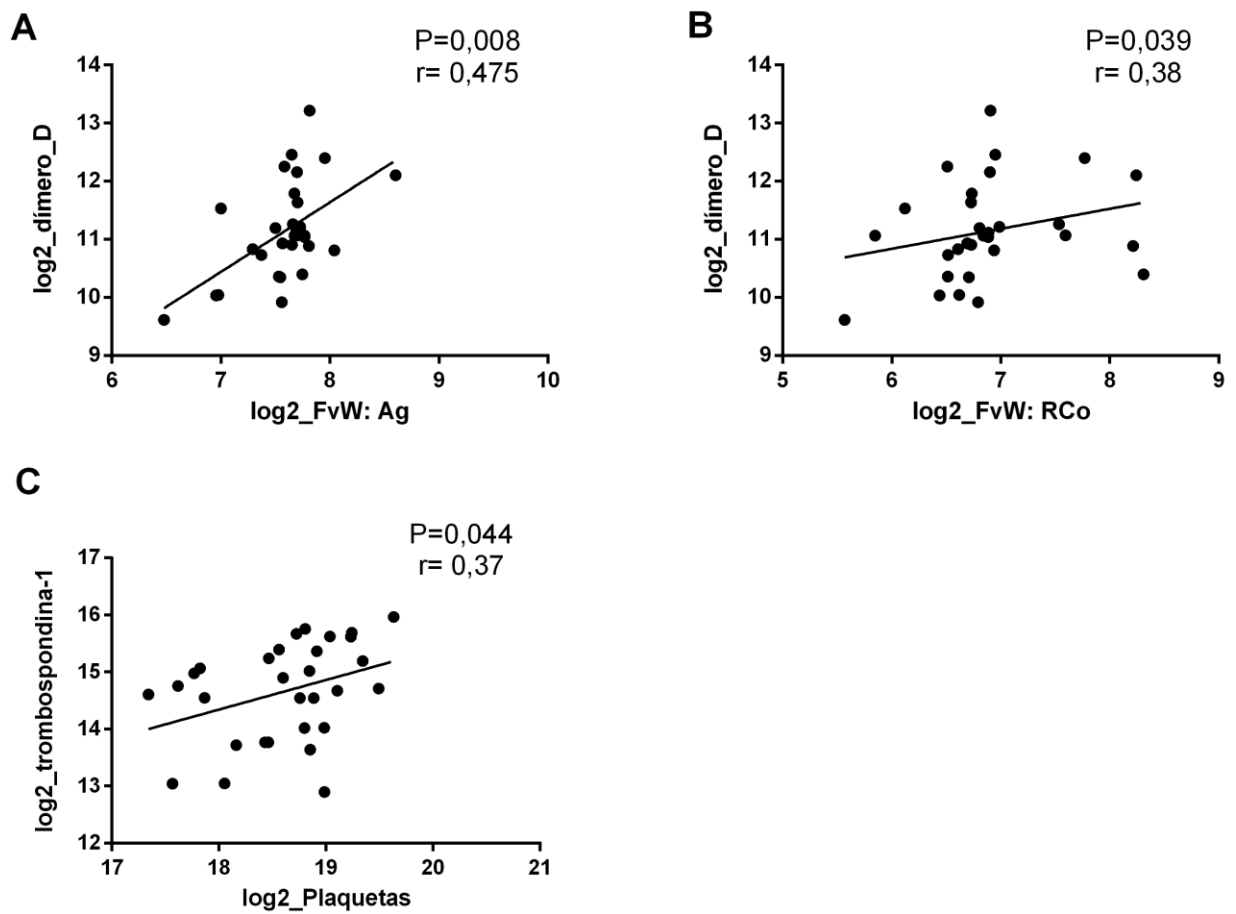


Figura 14: Correlação entre os marcadores de DE e de hipercoagulabilidade em pacientes HbSS. As variáveis foram transformadas em logaritmo de base 2. Os coeficientes de correlação r e os valores de p foram obtidos usando o teste não paramétrico “correlação de Spearman”.

6. DISCUSSÃO

A AF é caracterizada por eventos vaso-oclusivos e hemólise crônica, com a liberação da hemoglobina livre no plasma, resultando na redução da biodisponibilidade do NO vascular e na ativação anormal do endotélio, que são fatores que contribuem significativamente para a fisiopatologia dessa doença (70). No presente trabalho, buscou-se avaliar as associações entre os marcadores da hemólise (reticulócitos, LDH, pHb, heme total, sCD163), marcadores de disfunção endotelial (FvW:Ag, FvW:RCo, ADAMTS13:Ag, ADAMTS13:Act, TSP1 e ET-1) e marcadores de hipercoagulabilidade (dímero-D, fibrinogênio e TAT) para o melhor entendimento de seus papéis na fisiopatologia da AF em pacientes com e sem terapia com HU, comparando-os a controles saudáveis. Neste estudo foi observado um aumento significativo de VCM, hematócrito, Hb e HbF em pacientes HbSS_HU quando comparados aos pacientes HbSS. Nossos resultados corroboram com os resultados encontrados em vários estudos que mostraram o aumento de níveis de HbF, Hb, VCM, e hematócrito em pacientes adultos em terapia com HU (71–74). Os eritrócitos com mais HbF são maiores ou seja têm maior VCM, e mais flexíveis, devido ao aumento de concentração de Hb e hematócrito (62). Trata-se de um estudo transversal que analisou pacientes tratados ou não com HU e com a finalidade de explorar um pouco mais sobre essa terapia, os níveis de HbF dos pacientes em regime de HU foram avaliados em dois momentos distintos: antes e durante o tratamento. Assim, foi observado um aumento significativo dos níveis de HbF nos pacientes HbSS_HU durante o período de tratamento quando comparado ao período antes do tratamento, evidenciando o efeito da terapia com HU no que se refere a este parâmetro nos pacientes com AF. Esses achados corroboram com os resultados apresentados na literatura (71,72,75–78).

Quanto às complicações clínicas, foi observada uma diminuição da prevalência de úlcera de perna e de colelitíase em pacientes HbSS_HU quando comparados aos pacientes HbSS. A diminuição de ocorrência dessas manifestações clínicas em pacientes HbSS_HU pode ser devido ao aumento de níveis de HbF observado nesses pacientes. A HbF inibe a polimerização da HbS, que é a fisiopatologia subjacente da AF (79). Ela é o principal modulador das características clínicas e hematológicas da AF e seus níveis elevados foram associados a uma redução da taxa de episódios de CVO, menor prevalência de úlcera de perna e de

osteonecrose (80–82). No entanto, o nível de HbF não teve nenhuma associação clara com priapismo (83). Porém, no nosso estudo não houve uma diminuição significativa das frequências de episódios de CVO e de osteonecrose em pacientes HbSS_HU quando comparados aos pacientes HbSS. Isso pode ser devido a heterogeneidade da resposta de HU nesses pacientes. Existem pacientes com níveis muito baixos de HbF que apresentam sintomas leves, enquanto outros pacientes com níveis altos de HbF apresentam sintomas graves da AF. Além disso, aproximadamente 30% dos pacientes não respondem à terapia com HU (71).

Com relação aos marcadores de hemólise, foi observado o aumento de LDH, pHb em pacientes HbSS quando comparados aos pacientes HbSS_HU, enquanto os níveis de heme total foram aumentados em pacientes (HbSS e HbSS_HU) quando comparados aos controles (HbAA). A diminuição de pHb em pacientes HbSS_HU pode levar a redução da produção de espécies reativas de oxigênio e da depleção de NO. O aumento da biodisponibilidade do NO pode resultar na redução da ativação endotelial, da expressão de moléculas de adesão celular e ativação da coagulação (84). Quanto ao sCD163, foi observada uma redução significativa dos níveis desse marcador nos pacientes quando comparados ao grupo controle. Os achados de sCD163 no presente estudo corroboram os resultados encontrados no estudo de Moller e colaboradores (85) realizado com um grupo de pacientes pediátricos do Departamento de Saúde Infantil do Hospital "King's College" de Londres, no qual os níveis de sCD163 foram menores em pacientes com AF em terapia com HU do que nos controles. O sCD163 se liga ao complexo de Hp-Hb e, em função da liberação contínua da pHb, pode ocorrer o aumento da formação do complexo Hp-Hb e, conseqüentemente, o consumo de sCD163 em pacientes com AF (33), o que pode explicar a redução dos níveis desse receptor nos pacientes em comparação aos controles. Esses resultados podem refletir a intensidade de hemólise crônica em pacientes com AF.

Com relação aos marcadores de disfunção endotelial, foi observado maiores níveis de FvW:Ag e FvW:RCo em pacientes (HbSS e HbSS_HU) do que em controles (HbAA). Nossos resultados estão de acordo com os estudos de Al-Awadhi e colaboradores (39 pacientes adultos com AF e 59 adultos controles) realizado no Kuwait (86) e o estudo de Colombatti e colaboradores (38 crianças com AF e 50 crianças saudáveis) realizado na Itália (87), nos quais os níveis de FvW:Ag foram

maiores em pacientes com AF do que os controles saudáveis. Os níveis elevados de FvW:Ag em pacientes com AF foram sugeridos como resultado do aumento da sua secreção pelo endotélio ativado, pela eliminação ineficiente ou pelo processamento prejudicado pela ADAMTS13. Entretanto, houve uma diminuição de níveis de ADAMTS13:Ag e ADAMTS13:Act em pacientes do que em controles. Houve também uma diminuição do nível de ADAMTS13:Act em pacientes HbSS em comparação aos pacientes HbSS_HU. Esses resultados foram concordantes com os resultados de Colombatti e colaboradores que observaram a redução significativa de níveis de ADAMTS13:Act em pacientes com AF quando comparado ao grupo controle (87). Contrariamente aos nossos resultados, Al-Awadhi e colaboradores mostraram que os níveis de ADAMTS13:Act foram significativamente elevados em pacientes com AF quando foram comparados aos controles (86), enquanto Shnog e colaboradores observaram que os níveis de ADAMTS13:Act não diferiram significativamente entre pacientes com AF (n=8) e os controles (n=14) em Curaçao (36). Além disso, foi observado um aumento de níveis de ET-1 quando pacientes foram comparados aos controles. Entretanto, os níveis de ET-1 não foram significativamente diferentes entre os grupos HbSS_HU e HbSS. Esses resultados estão de acordo com os estudos de Hatzipantelis e colaboradores (41 crianças com AF e 28 crianças saudáveis) realizado na Grécia (88) e o estudo de Graido-Gonzalez e colaboradores (13 pacientes adultos com AF e 11 adultos controles) realizado nos Estados Unidos (89), nos quais os níveis de ET-1 foram maiores em pacientes com AF do que os controles saudáveis. Por outro lado, em outro estudo realizado por Belaid e colaboradores na Bélgica em 16 crianças com AF em terapia com HU e 17 crianças com AF sem terapia com HU, no qual foi observada a redução significativa dos níveis de ET-1 em pacientes com terapia com HU em comparação aos pacientes sem terapia com HU (90). Também, houve um aumento de níveis de TSP1 quando pacientes foram comparados aos controles e os níveis desse marcador foram significativamente elevados em pacientes HbSS em comparação aos pacientes HbSS_HU. Nossos achados concordam com outros estudos realizados em diferentes populações: Adegoke e colaboradores, na Nigéria, com 32 crianças com AF comparadas a um grupo controle pediátrico (n=28) (91), Hagag e colaboradores, no Egito, com 30 crianças com AF e 20 crianças controles (92) e Novelli e colaboradores, nos Estados Unidos, com 27 pacientes adultos com AF e 17 adultos

controles (46), nos quais foi observado o aumento significativo dos níveis TSP-1 em pacientes com AF quando comparados ao grupo controle.

A TSP1 é um potente vasoconstritor liberado pelas plaquetas ativadas, fornecendo *feedback* positivo para reforçar a agregação plaquetária, inibindo a produção de NO que tem uma atividade antitrombótica (48). Além disso, a TSP1 promove a adesão de eritrócitos falciformes ao endotélio microvascular, o que implica em sua participação na etiopatogenia da vaso-oclusão na AF (91). O tratamento com HU pode resultar na redução da hemólise e da contagem de plaquetas em pacientes com AF e, dessa forma, espera-se a limitação da ativação plaquetária (46). O tratamento com HU diminui os níveis de TSP1 em pacientes com AF, portanto, como esperado, em nosso estudo essa redução foi observada quando os pacientes em terapia foram comparados aos pacientes sem terapia.

A diminuição dos níveis de ADAMTS13:Act em pacientes, particularmente naqueles sem terapia com HU pode ser explicado pelo aumento da TSP1 e pHb nesses pacientes. Em estudos prévios, foi demonstrado *in vitro* que a TSP1 e/ou pHb liga-se ao domínio A2 no multímeros do FvW no sítio proteolítico da metaloprotease, ADAMTS13, e impede a degradação desses multímeros, por inibição competitiva da atividade da metaloprotease (49,50). Dessa forma, foi sugerido que altos níveis de TSP1 e pHb na AF conduzem à inibição da proteólise do FvW pela ADAMTS13 e pode representar uma via alternativa para a formação de multímeros do FvW nesta doença (51). Então, uma diminuição dos níveis de TSP-1 e pHb em pacientes com HU podem conduzir ao aumento de níveis de ADAMTS13:Act nesses pacientes em comparação aos pacientes sem terapia. Além disso, a diminuição de níveis de ADAMTS13:Ag nos pacientes (HbSS e HbSS_HU) aqui estudados pode ser explicada pelo aumento de neutrófilos nesses pacientes quando comparados aos controles. Os neutrófilos ativados secretam a protease elastase, que tem a capacidade de ligar-se ao ADAMTS13:Ag e degradá-lo (93). Por outro lado, quando avaliados os níveis de ADAMTS13:Ag entre os dois grupos de pacientes (HbSS vs HbSS_HU), não houve diferença significativa, uma vez que a contagem de neutrófilos não diferiu entre esses pacientes.

Considerando os marcadores de hipercoagulabilidade, houve um aumento dos níveis de dímero-D e TAT em pacientes (HbSS e HbSS_HU) quando foram comparados aos controles. Nossos resultados foram consistentes com os

resultados dos estudos de Ataga e colaboradores em um estudo realizado nos Estados Unidos com 56 pacientes adultos com AF e 6 adultos controles (94), e no estudo realizado por Ragab e colaboradores no Egito com 24 crianças com AF e 24 crianças controles (95), nos quais foi observado o aumento significativo da contagem de plaquetas em pacientes com AF quando comparados ao grupo controle. Além disso, Colella e colaboradores, no Brasil (Campinas-SP), com 39 pacientes adultos com AF e 27 adultos controles (96), Ataga e colaboradores, Ragab e colaboradores mostraram um aumento dos níveis de dímero-D em pacientes com AF em comparação aos controles (94,95). Nos estudos realizados por Whelihan e colaboradores nos Estados Unidos com 25 pacientes adultos com AF e 25 adultos controles (97), Colella e colaboradores, Ataga e colaboradores, Ragab e colaboradores, nos quais eles observaram um aumento dos níveis de TAT em pacientes com AF em comparação aos controles.

Entretanto, os níveis de dímero-D e TAT não foram significativamente diferentes entre os grupos HbSS_HU e HbSS. Por outro lado, em outro estudo realizado por Brunetta e colaboradores no Brasil (São Paulo) em 10 pacientes adultos com AF em terapia com HU e 13 adultos com AF sem terapia com HU, no qual foi observada a redução significativa dos níveis de dímero-D em pacientes com terapia com HU em comparação aos pacientes sem terapia com HU (98). Colella e colaboradores no estudo realizado no Brasil com 23 pacientes adultos com AF em terapia com HU e 15 adultos com AF sem terapia com HU, e Brunetta e colaboradores relataram a redução significativa dos níveis de TAT em pacientes com terapia com HU em comparação aos pacientes sem terapia com HU (98,99). Ao contrário do que esperado, o nível de fibrinogênio diminuiu em pacientes HbSS em comparação aos pacientes HbSS_HU e controles. A diminuição do nível de fibrinogênio em pacientes HbSS pode ser devido ao consumo de fibrinogênio nesses pacientes. Esses resultados evidenciam uma ativação crônica da coagulação nesses pacientes.

A ausência da diminuição dos níveis de FvW:Ag, FvW:RCo, ET-1, dímero-D, TAT e do aumento de ADAMTS13:Ag em pacientes com terapia com HU pode ser devido ao tamanho amostral da população investigada no presente estudo, relativamente pequeno, ao mecanismo de ação de HU que ainda não está bem

esclarecida, a resposta da HU que é heterogênea entre os pacientes ou à combinação dessas possibilidades.

Em relação às correlações entre os marcadores de HI e DE, houve uma correlação positiva forte entre os níveis de FvW:Ag e FvW:RCo e uma correlação forte/moderada entre os níveis de ADAMTS13:Ag e ADAMTS13:Act nos dois grupos de pacientes. Essas correlações mostraram que os níveis de ADAMTS13:Ag e FvW:Ag aumentaram com os níveis de ADAMTS13:Act e FvW:RCo, respectivamente. Isso significa que a maior parte dos antígenos de ADAMTS13 sintetizado é funcional e por outro lado, os antígenos circulantes de FvW (FvW:Ag), de forma considerável, tem a capacidade de se ligar às plaquetas (FvW:RCo). Além disso, no grupo HbSS_HU, foi observada uma correlação positiva moderada de heme_total com os níveis de FvW:Ag e LDH. Adicionalmente, houve uma correlação negativa moderada entre os níveis de ADAMTS13:Act e heme_total; LDH e HbF, ADAMTS13:Act e LDH; FvW:Ag e HbF. Esses resultados mostraram uma relação inversa entre ADAMTS13:Act e heme total e uma relação positiva entre heme total e FvW:Ag. O estudo de Lu et al., revelou que a bilirrubina indireta, um metabólito da degradação do heme, pode se ligar aos multímeros de FvW e impedir a sua clivagem por ADAMTS13 (100), o que pode levar a uma diminuição da atividade de ADAMTS13 (ADAMTS13:Act) e ao aumento de FvW:Ag. Portanto a elevação dos níveis de heme, consequentemente, pode levar a diminuição da atividade de ADAMTS13 e ao aumento de FvW:Ag em pacientes em terapia com HU. Adicionalmente, a relação inversa observada entre HbF vs LDH e HbF vs FvW:Ag, retrata que o aumento dos níveis de HbF resulta na redução do grau de hemólise, observado pela redução dos níveis de LDH e, consequentemente, à diminuição da ativação endotelial, como consequência da redução de FvW:Ag.

Porém, no grupo HbSS, foi observada uma correlação positiva fraca entre os níveis de LDH e pHb. Dessa forma, as correlações observadas entre os marcadores de HI e DE apontam para que a ativação anormal do endotélio nos pacientes com AF pode ser resultado, pelo menos em parte, do sequestro de NO provocado pela pHb e/ou heme.

Quanto às correlações entre os marcadores de DE e de hipercoagulabilidade, foi observado nos dois grupos de pacientes uma correlação positiva moderada entre os níveis de dímero-D e FvW:Ag. Além disso, houve uma

correlação moderada/fraca entre os níveis de TSP-1 e plaquetas; dímero-D e FvW:RCO. Essas correlações mostraram que o aumento da contagem das plaquetas levou ao aumento dos níveis de TSP-1 e os níveis de FvW aumentou concomitantemente com os níveis de dímero-D. Em locais de dano vascular, o FvW sintetizado por células endoteliais e megacariócitos, liga-se ao colágeno presente no subendotélio e nas plaquetas ativadas, promovendo assim, adesão e agregação plaquetária. As plaquetas ativadas secretam rapidamente a TSP-1 de seus grânulos α , que participam da agregação plaquetária que faz parte do processo da coagulação. A ativação da coagulação leva ao aumento de níveis de dímero-D.

Além disso, foi observado uma correlação negativa moderada entre os níveis de TAT e ADAMTS13:Act em pacientes HbSS_HU. Adicionalmente, é possível sugerir que a DE favorece o quadro da hipercoagulabilidade nos pacientes com AF de acordo com as correlações observadas entre esses marcadores.

De nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia a influência da terapia de HU sobre os níveis de FvW:Ag, FvW:RCo, ADAMTS13:Ag e ADAMTS13:Act. Porém, o referido estudo tem como limitações o tamanho amostral e o tempo de tratamento muito variável daqueles pacientes em terapia com HU.

7. CONCLUSÕES

- Os níveis de marcadores de HI (LDH, pHb) nos pacientes HbSS_HU foram significativamente menores em comparação aos pacientes HbSS.
- Os níveis de FvW:Ag, FvW:RCo, TSP-1 e ET-1 em pacientes com AF (HbSS e HbSS_HU) foram significativamente elevados em comparação aos controles, enquanto ADAMTS13:Ag e ADAMTS13:Act foram significativamente diminuídos em pacientes com AF quando comparados aos controles.
- Os níveis de TSP-1 foram significativamente elevados em pacientes HbSS em comparação aos pacientes HbSS_HU, enquanto os níveis de ADAMTS13:Act foram significativamente diminuídos em pacientes HbSS.
- Os níveis de TAT e dímero-D foram significativamente elevados em pacientes com AF em comparação aos controles.
- O nível de fibrinogênio diminuiu em pacientes HbSS em comparação aos pacientes HbSS_HU e controle, evidenciando o consumo desse marcador em pacientes HbSS.

Os níveis elevados de TSP-1 e de pHb em pacientes HbSS foram associados aos níveis reduzidos de ADAMTS13:Act nesses pacientes. Apesar, da diminuição dos níveis de ADAMTS13:Act, não houve um aumento dos níveis de FvW:Ag e FvW:RCo e da taxa de coagulação (TAT e dímero-D) em pacientes HbSS em comparação aos pacientes HbSS_HU. Adicionalmente, a hemólise favorece o DE que por sua vez favorece o quadro da hipercoagulabilidade em pacientes com AF de acordo com as correlações observadas entre esses marcadores.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Weatherall D, Akinyanju O, Fucharoen S, Olivieri N, Musgrove P. Inherited Disorders of Hemoglobin. Dis Control Priorities Dev Ctries. 2006;Chapter 34:663–80.
2. Roberts-harewood M. Inherited haemolytic anaemias. Medicine (Baltimore) [Internet]. Elsevier Ltd.; 2009;37(3):143–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2009.01.002>
3. Bunn H., Forget B. Hemoglobin:Molecular, Genetic and Clinical Aspects. Cell. 1986;48:731.
4. McGann TP. Sickle Cell Anemia: An Underappreciated and Unaddressed Contributor to Global Childhood Mortality. J Pediatr. 2014;165:18–22.
5. OMIM 0243. HEMOGLOBIN--BETA LOCUS; HBB [Internet]. Available from: https://omim.org/entry/141900#141900_AllelicVariant0243
6. Nagel R., Labie D. DNA haplotypes and the beta s globin gene . Prog Clin Biol Res. 1989;371–93.
7. Steinberg MH. Sickle Cell Anemia , the First Molecular Disease : Overview of Molecular Etiology , Pathophysiology , and Therapeutic Approaches. Sci World J. 2008;8:1295–324.
8. Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. Rev.bras.hematol.hemoter. 2007;29(3):204–6.
9. PNTN. Saúde Doenças Falciformes (DF) e outras Hemoglobinopatias [Internet]. 2017. p. 1–6. Available from: <http://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-da-triagem-neonatal/doencas-falciformes-df-e-outras-hemoglobinopatias>
10. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. Lancet. 2004;364:1343–60.
11. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. N Engl J Med. 1997;337:762–9.
12. Zago MA, Pinto Silva CA. Fisiopatologia das doenças falciformes : da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. Rev.bras.hematol.hemoter. 2007;29(3):207–14.
13. Madigan C, Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies Part I : sickle cell disease. Expert Rev Mol Med. 2006;8(9):1–23.
14. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-frempong K, Krishnamurti L, et

- al. Sick cell disease. *Nat Rev* [Internet]. Macmillan Publishers Limited; 2018;4:1–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.10>
15. Kaul DK, Finnegan E, Barabino GA. Sick Red Cell - Endothelium Interactions. *Microcirculation*. 2009;16(1):97–111.
 16. Hines PC, Zen Q, Burney SN, Shea DA, Ataga KI, Orringer EP, et al. Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of BCAM / Lu-dependent sick (SS) RBC adhesion. *Blood*. 2003;101(8):3281–7.
 17. Setty BN., Stuart MJ. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Is Involved in Mediating Hypoxia- Induced Sick Red Blood Cell Adherence to Endothelium: Potential Role in Sick Cell Disease. *Blood*. 1996;88:2311–20.
 18. Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM. Pathophysiology of Sick Cell Disease. *AnnuRevPatholMechDis*. 2019;263–92.
 19. Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF. Newer Aspects of the Pathophysiology of Sick Cell Disease Vaso-Occlusion. *Int J hemoglobin Res*. 2009;33:1–26.
 20. Steinberg MH. Overview of Sick Cell Anemia Pathophysiology. Sick cel. Costa F, Conran N, editors. University of Illinois at Chicago , USA; 2016. 49-74
 21. Silveira AAA, Mahon O, Corr EM, Mendonça R, Saad STO, Costa FF, et al. S100A8 acts as an autocrine priming signal for heme-induced human M ? pro-inflammatory responses in hemolytic inflammation. *J Leukoc Biol*. 2019;1–9.
 22. Toledo SLO, Guedes JVM, Alpoim PN, Rios DRA, Pinheiro MB. Sick cell disease : Hemostatic and in fl ammatory changes , and their interrelation. *Clin Chim acta*. 2019;493(February):129–37.
 23. Conran N, Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clin Biochem* [Internet]. The Canadian Society of Clinical Chemists; 2009;42(18):1824–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.06.024>
 24. Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem*. 1996;42:1589–600.
 25. Vlierberghe H Van, Langlois M, Delanghe J. Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease. *Clin Chim acta*. 2004;345:35–42.
 26. Chintagari NR, Nguyen J, Belcher JD, Vercellotti GM, Alayash AI. Blood Cells , Molecules and Diseases Haptoglobin attenuates hemoglobin-induced heme

- oxygenase-1 in renal proximal tubule cells and kidneys of a mouse model of sickle cell disease. *Blood Cells, Mol Dis*. 2015;54:302–6.
27. Roumenina LT, Rayes J, Lacroix-desmazes S, Dimitrov JD. Heme : Modulator of Plasma Systems in Hemolytic Diseases. *Trends Mol Med* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;22(3):200–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2016.01.004>
 28. Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemolysis and free hemoglobin revisited : exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*. 2013;121(8):1276–85.
 29. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. *AnnuRevPharmacolToxicol*. 2010;50:323–54.
 30. Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemolysis and free hemoglobin revisited : exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*. 2013;121(8):1276–84.
 31. Fabriek BO, Moller HJ, Vloet RPM, Winsen LM Van, Hanemaaijer R, Teunissen CE, et al. Proteolytic shedding of the macrophage scavenger receptor CD163 in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2007;187:179–86.
 32. Moller HJ. Soluble CD163. *Scand J Clin Lab Investig*. 2012;72:1–13.
 33. Moller HJ, Nielsen MJ, Maniecki MB, Madsen M, Moestrup SK. Soluble macrophage-derived CD163 : A homogenous ectodomain protein with a dissociable haptoglobin – hemoglobin binding. *Immunobiology* [Internet]. Elsevier; 2010;215(5):406–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2009.05.003>
 34. Bulters D, Gaastra B, Zolnourian A, Alexander S, Ren D, Blackburn SL, et al. Haemoglobin scavenging in intracranial bleeding: biology and clinical implications. *Nat Rev Neurol*. 2018;1–17.
 35. Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. Activated monocytes in sickle cell disease : potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood*. 2000;96(7):2451–60.
 36. Schnog JB, Hovinga JAK, Krieg S, Akin S, Lammle B, Brandjes DPM, et al. ADAMTS13 Activity in Sickle Cell Disease. *Am J Hematol*. 2006;81:492–8.
 37. Reiter C, Gladwin M. emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy. *Curr Opin Hematol*. 2003;10:99–107.

38. Zhou Z, Han H, Cruz MA, López JA, Dong J, Guchhait P. Haemoglobin blocks von Willebrand factor proteolysis by ADAMTS-13: A mechanism associated with sickle cell disease. *Thromb Haemost.* 2009;101:1070–7.
39. Chen J, Hobbs WE, Le J, Lenting PJ, Groot PG, Lopez J, et al. The rate of hemolysis in sickle cell disease correlates with the quantity of active von Willebrand factor in the plasma. *Blood.* 2011;117(13):3680–4.
40. Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, Chung D. Purification of human von Willebrand factor – cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood.* 2001;98:1662–6.
41. Goodeve AC. The genetic basis of von Willebrand disease. *Blood Rev* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;24(3):123–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2010.03.003>
42. López JA, Dong J. Cleavage of von Willebrand Factor by ADAMTS-13 on Endothelial Cells. *Semin Hematol.* 2004;41(1):15–23.
43. Groot R, Lane DA, Crawley JTB. The ADAMTS13 metalloprotease domain: roles of subsites in enzyme activity and specificity. *Blood.* 2010;116(16):3064–72.
44. Claus RA, Bockmeyer CL, Sossdorf M, Lösche W. The Balance between von-Willebrand Factor and its Cleaving Protease ADAMTS13: Biomarker in Systemic Inflammation and Development of Organ Failure? *Curr Mol Med.* 2010;10:236–48.
45. Zhou Z, Yee DL, Guchhait P. Molecular Link between Intravascular Hemolysis and Vascular Occlusion in Sickle Cell Disease. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012;10:756–61.
46. Novelli EM, Kato GJ, Ragni M V, Zhang Y, Hildesheim ME, Nouraie M, et al. Plasma thrombospondin-1 is increased during acute sickle cell vaso-occlusive events and associated with acute chest syndrome, hydroxyurea therapy, and lower hemolytic rates. *Am J Hematol.* 2012;87(3):326–30.
47. Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol.* 2002;9:101–6.
48. Roberts DD, Miller TW, Rogers NM, Yao M, Isenberg JS. The Matricellular Protein Thrombospondin-1 Globally Regulates Cardiovascular Function and Responses to Stress via CD47. *Matrix Biol.* 2012;31(3):162–9.

49. Bonnefoy A, Daenens K, Feys HB, Vos R, Vandervoort P, Vermeylen J, et al. Thrombospondin-1 controls vascular platelet recruitment and thrombus adherence in mice by protecting (sub) endothelial VWF from cleavage by ADAMTS13. *Blood*. 2006;107(3):955–65.
50. Wang A, Liu F, Dong N, Ma Z, Zhang J, Su J, et al. Thrombospondin-1 and ADAMTS13 competitively bind to VWF A2 and A3 domains in vitro. *Thromb Res* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;126(4):e260–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2010.07.009>
51. Novelli EM, Kato GJ, Hildesheim ME, Barge S, Meyer MP, Lozier J, et al. Thrombospondin-1 inhibits ADAMTS13 activity in sickle cell disease. *Haematologica*. 2013;98:132–4.
52. Solovey A, Kollander R, Shet A, Milbauer LC, Choong S, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin. *Blood*. 2004;104:840–6.
53. Ataga KI, Brittain JE, Desai P, May R, Jones S, Delaney J, et al. Association of Coagulation Activation with Clinical Complications in Sickle Cell Disease. *PLoS One*. 2012;7(1):1–9.
54. Stein PD, Beemath A, Meyers FA, Skaf E, Olson RE. Deep venous thrombosis and pulmonary embolism in hospitalized patients with sickle cell disease. *Am J Med*. 2006;119:897.e7–11.
55. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, et al. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. *N Engl J Med*. 2000;342:1855–65.
56. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;376:2018–31. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61029-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61029-X)
57. Monroe D, Hoffman M, Roberts H. Platelets and thrombin generation . *Arter Thromb Vasc Biol*. 2002;22(9):1381–9.
58. Shah N, Thornburg C, Telen MJ, Ortel TL. Characterization of the Hypercoagulable State in Patients with Sickle Cell Disease. *Thromb Res*. 2012;130(5):e241–5.
59. Westerman MP, Green D, Gilman-sachs A, Beaman K, Freels S, Boggio L, et

- al. Original articles. *J Lab Clin Med*. 1999;352–62.
60. Pakbaz Z, Wun T. Role of the Hemostatic System on SCD Pathophysiology and Potential Therapeutics. 2015;28(2):355–74.
 61. Verma HK, Lakkakula S, Lakkakula BVKS. Retrospection of the effect of hydroxyurea treatment in patients with sickle cell disease. *Acta Haematol Pol*. 2018;49:1–8.
 62. McGann PT, Ware RE. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. *Expert Opin Drug Saf*. 2015;14(11):1749–58.
 63. Lebensburger JD, Pestina TI, Ware RE, Boyd KL, Persons DA. Hydroxyurea therapy requires HbF induction for clinical benefit in a sickle cell mouse model. *Haematologica*. 2010;95(9):1599–603.
 64. Agrawal RK, Patel RK, Shah V, Nainiwal L, Trivedi B. Hydroxyurea in Sickle Cell Disease : Drug Review. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2014;30:91–6.
 65. Ware RE. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2010;115(26):5300–11.
 66. Gladwin MT, Kato GJ. Cardiopulmonary Complications of Sickle Cell Disease: Role of Nitric Oxide and Hemolytic Anemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2005;51–7.
 67. Odièvre M, Bony V, Benkerrou M, Lapoumériou C, Alberti C, Ducrocq R, et al. Modulation of erythroid adhesion receptors expression by hydroxyurea in children with sickle cell disease. *Haematologica*. 2008;93(4):502–10.
 68. Pinto VM, Balocco M, Quintino S, Forni GL. Sickle cell disease : a review for the internist. *Intern Emerg Med* [Internet]. Springer International Publishing; 2019;1–14. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11739-019-02160-x>
 69. Lanzkron S, Strouse JJ, Wilson R, Beach MC, Haywood C, Park H, et al. Systematic Review: Hydroxyurea for the Treatment of Adults with Sickle Cell Disease. *Ann Intern Med*. 2008;148(5):939–55.
 70. Almeida CB, Souza LEB, Leonardo FC, Costa FTM, Werneck CC, Covas DT, et al. Acute hemolytic vascular inflammatory processes are prevented by nitric oxide replacement or a single dose of hydroxyurea. *Blood*. 2015;126(6):711–21.
 71. Ballas SK, Connes P, Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell, Anemia. Rheological properties of sickle erythrocytes in patients

- with sickle cell anaemia: the effect of hydroxyurea, fetal hemoglobin and α -thalassaemia. *Eur J Haematol*. 2019;101(6):798–803.
72. Nader E, Grau M, Fort R, Collins B, Cannas G, Gauthier A, et al. Hydroxyurea therapy modulates sickle cell anaemia red blood cell physiology: Impact on RBC deformability, oxidative stress, nitrite levels and nitric oxide synthase signalling pathway. *Nitric Oxide* [Internet]. Elsevier Inc.; 2018;1–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.10.003>
 73. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert S V., et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 1995;332(20):1318–22.
 74. Charache S, Barton FB, D.Moore R, Terrin ML, Steinberg MH, J.Dover G, et al. Hydroxyurea and sickle cell anemia-Clinical utility of a myelosuppressive“ Switching” agent. *Med*. 1996;75:300–26.
 75. El-Hazmi MAF, Warsy AS, Al-Momen A, Harakati M. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell disease. *Acta Heamatology*. 1992;88:170–4.
 76. Lemonne N, Mockesch B, Charlot K, Garnier Y, XavierWaltz, Lamarre Y, et al. Effects of hydroxyurea on blood rheology in sickle cell anemia : A two-years follow-up study. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2017;67:141–8.
 77. Lemonne N, Charlot K, Waltz X, Ballas SK, Lamarre Y, Lee K, et al. Hydroxyurea treatment does not increase blood viscosity and improves red blood cell rheology in sickle cell anemia. *Haematologica*. 2015;100:e383–6.
 78. Vicari P, Mello AB, Figueiredo MS. Effects of Hydroxyurea in a Population of Brazilian Patients With Sickle Cell Anemia. *Am J Hematol*. 2005;78:243–4.
 79. Poillon WN, Kim BC, Rodgers GP, Noguchi CT, Schechter AN. Sparing effect of hemoglobin F and hemoglobin A2 on the polymerization of hemoglobin S at physiologic ligand saturations. *ProcNatlAcadSciUSA*. 1993;90:5039–43.
 80. Castro O, Brambilla DJ, Bruce Thorington, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P, et al. The Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease: Incidence and Risk Factors. *Blood*. 1994;84:643–9.
 81. Ma Q, Wyszynski DF, Farrell JJ, Kutlar A, Farrer LA, Baldwin CT, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genetic determinants of response to hydroxyurea. *Pharmacogenomics J*. 2007;386–94.
 82. Platt O., Thorington B., D.J Brambilla, Milner P., Rosse W., Vichinsky E, et al.

- Pain in sickle cell disease-rates and risk factor. *N Engl J Med*. 1991;325:11–6.
83. Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin CT, Sebastiani P, et al. Review article Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*. 2011;118:19–27.
 84. Van Der Land V, Peters M, Biemond BJ, Heijboer H, Harteveld CL, Fijnvandraat K. Markers of endothelial dysfunction differ between subphenotypes in children with sickle cell disease. *Thromb Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;132(6):712–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2013.10.006>
 85. Moller HJ, Nielsen MJ, Bartram J, Dick MC, Height SE, Moestrup SK, et al. Soluble CD163 levels in children with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2011;153(February):105–10.
 86. Al-awadhi A, Adekile A, Marouf R. Evaluation of von Willebrand factor and ADAMTS-13 antigen and activity levels in sickle cell disease patients in Kuwait. *J Thromb Thrombolysis* [Internet]. Springer US; 2017;43(1):117–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11239-016-1418-4>
 87. Colombatti R, Bon E, Bertomoro A, Casonato A, Pontara E, Omenetto E, et al. Coagulation Activation in Children with Sickle Cell Disease Is Associated with Cerebral Small Vessel Vasculopathy. *PLoS One*. 2013;8(10):1–8.
 88. Hatzipantelis ES, Pana ZD, Gombakis N, Taparkou A, Tzimouli V, Kleta D, et al. Endothelial activation and inflammation biomarkers in children and adolescents with sickle cell disease. *Int J Hematol*. 2013;98:158–63.
 89. Graido-gonzalez BE, Doherty JC, Bergreen EW, Organ G, Telfer M, Mcmillen MA. Plasma Endothelin-1, Cytokine, and Prostaglandin E 2 Levels in Sickle Cell Disease and Acute Vaso-Occlusive Sickle Crisis. *Blood*. 1998;92:2551–6.
 90. Belaid Z, Hubint F, Humblet C, Boniver J, Nusgens B, Defresne M-P. Decreased plasma endothelin-1 levels in children with sickle cell disease treated with hydroxyurea. *Haematologica*. 2003;90:4001–403.
 91. Adegoke SA, Smith OS, Adeniyi AT, Adekile AD. Thrombospondin-1 and Vitamin D in Children With Sickle Cell Anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2018;00(00):1–5.
 92. Hagag AA, Elmashad G, El-lateef AEA. Clinical Significance of Assessment of Thrombospondin and Placenta Growth Factor Levels in Patients with Sickle Cell Anemia : Two Centers Egyptian Studies. *Mediterr J Hematol Infect Dis*.

- 2014;6:1–6.
93. Ono T, Mimuro J, Madoiwa S, Soejima K, Kashiwakura Y, Ishiwata A, et al. Severe secondary deficiency of von Willebrand factor – cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with development of renal failure. *Blood*. 2006;107(2):528–35.
 94. Ataga KI, Moore CG, Hillery CA, Jones S, Whinna HC, Strayhorn D, et al. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. *Haematologica*. 2008;93:20–6.
 95. Ragab SM, Soliman MA. Tissue factor-positive monocytes expression in children with sickle cell disease: clinical implication and relation to inflammatory and coagulation markers. *Blood Coagul fibrinolysis*. 2016;862–9.
 96. Colella MP, Paula E V, Machado-neto JA, Conran N, Annichino-bizzacchi JM, Costa FF, et al. Elevated hypercoagulability markers in hemoglobin SC disease. *Haematologica*. 2015;100(4):466–71.
 97. Whelihan MF, Lim MY, Mooberry MJ, Piegore MG, Ilich A, Wogu A, et al. Thrombin generation and cell-dependent hypercoagulability in sickle cell disease. *J Thromb Haemost*. 2016;14(January):1941–52.
 98. Brunetta DM, Santis GC, Silva-Pinto AC, Oliveira LC, Covas DT. Hydroxyurea increases plasma concentrations of microparticles and reduces coagulation activation and fibrinolysis in patients with sickle cell anemia. *Acta Haematology*. 2015;33:287–94.
 99. Colella MP, Paula E V., Conran N, Machado-Neto JA, Annicchino-Bizzacchi JM, Costa FF, et al. Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia. *J Thromb Haemost*. 2012;10:1967–70.
 100. Lu R, Yang S, Wu HM, Zheng XL. Unconjugated Bilirubin Inhibits Proteolytic Cleavage of von Willebrand Factor by ADAMTS13 Protease. *J Thromb Haemost*. 2016;13(6):1064–72.

9. APÊNDICES

Cabe destacar que foram desenvolvidas outras atividades, as quais resultaram em resumos apresentados em congressos internacional ASH 2017 e nacional Hemo 2019, e em artigo publicado.

9.1. Resumo apresentado em congresso internacional ASH 2017



113. HEMOGLOBINOPATHIES, EXCLUDING THALASSEMIA—BASIC AND TRANSLATIONAL SCIENCE: POSTER
I | DECEMBER 7, 2017

PADI4 Gene Polymorphism As a Risk Factor for Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Anemia Patients

Francine Chenou, Bidossessi Wilfried Hounkpe, Dulcinéia Martins de Albuquerque, Igor de Farias Domingos, Aderson da Silva Araujo, Marcos Andre Cavalcanti Bezerra, Fernando Ferreira Costa, MD PhD, Maria de Fátima Sonati, Erich Vinicius De Paula, MD PhD, Magnun Nueldo Nunes Santos



Blood (2017) 130 (Supplement 1): 954.

https://doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl_1.954.954

Abstract

Introduction: Sickle cell anemia (SCA) is a chronic inflammatory disease with heterogeneous clinical features and the reasons for the heterogeneity of the clinical manifestations has not been fully elucidated. New mediators of the pathogenesis of SCA described recently include the formation of Neutrophil Extracellular Traps (NETs), which may contribute to the amplification of inflammation via the production of pro-inflammatory mediators. Peptidylarginine Deiminase 4 (PADI4) is a critical regulator of NETosis by mediating histone citrullination, an essential step for the generation of NETs. There appears to be a relationship between *PADI4* gene polymorphisms and the pathophysiology of other inflammatory diseases in which NETosis seems to be relevant. Our aim was to investigate the association of *PADI4* gene polymorphisms [rs874881(G>C), rs1748033(T>C), rs11203366(G>A), rs11203367 (T >C), rs2240340 (T>C)], which have been previously associated with increased *PADI4* mRNA stability and with some clinical manifestations in cohorts of SCA patients. **Methods:** The study included 194 SCA patients (93 males and 101 females with mean age 33.29 ± 9.54 years) being followed up at the Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco (HEMOPE), Recife, Brazil. *PADI4* gene polymorphisms were performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and their products were sequenced using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1 (Applied Biosystems, CA, USA). These results obtained were compared with the clinical data obtained from the patients' records. Ethical approval was obtained from Ethics Committee of HEMOPE and all patients gave informed consent. **Results:** The frequencies of the genotypes found were as follows: rs874881 (22.2% GG, 50.5% GC, 27.3% CC); rs1748033 (17% TT, 42.3% TC, 40.7% CC); rs11203366 (21.1% GG, 50% GA, 28.9% AA); rs11203367 (20.6% TT, 49.5% TC, 29.9% CC); rs2240340 (24.7% TT, 46.4% TC, 28.9% CC). The distribution of the genotypes was in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). Twenty-four patients (12.4%) presented with a history of acute chest syndrome (ACS), 27 (13.9%) with stroke, 168 (86.6%) with vaso-occlusive crisis (VOC), and 81 (47.8%) with leg ulcers (LU). No association was observed between the polymorphisms studied

rs1748033 with the G and T alleles, respectively, were associated with a higher risk of ACS (OR: 2.96, $p = 0.02$ and OR: 4.75, $p = 0.01$, respectively). **Conclusion:** In the present study, we found an association between the wild type alleles (rs874881G and rs1748033T) and a history of ACS in our cohort of SCA patients. There is need for future studies on these polymorphisms in larger cohorts of SCA patients to affirm this association.

Disclosures

No relevant conflicts of interest to declare.

9.2. Resumo apresentado em congresso nacional Hemo 2019

S32

Hematology, Transfusion and Cell Therapy – HEMO 2019

serviços de saúde e tratamento especializado. Em associação à gravidade clínica da DF, o quadro fisiopatológico consiste em múltiplos fatores que se reúnem em quatro grandes eventos: polimerização da hemoglobina S, disfunção endotelial mediado por hemólise, processo inflamatório e vaso-oclusão. A somatória desses fatores associados com a fisiopatologia da DF exerce influência significativa no curso clínico da doença. **Conclusão:** Este estudo sugere importância na avaliação do IMC e perfil socioeconômico como fator preditor de gravidade na DF para estabelecimento de um manejo clínico adequado e individualizado.

82 POLIMORFISMO DO GENE DA ENDOTELINA-1 (EDN1) E MARCADORES DE INFLAMAÇÃO NA ANEMIA FALCIFORME

Chenou F^a, Hounkpe BW^b, Albuquerque DM^c, Domingos IP^d, Araújo AS^e, Bezerra MAC^d, Costa FF^a, Sonati MF^a, Paula EV^b, Santos MNN^a

^a Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^b Departamento de Fisiopatologia Médica, Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^c Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^d Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

^e Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HemoPE), Recife, PE, Brasil

Introdução: A anemia falciforme (AF) é uma doença inflamatória crônica, de quadro clínico heterogêneo. As razões para a heterogeneidade das manifestações clínicas ainda não são completamente conhecidas. Embora os polimorfismos do gene da endotelina-1 (EDN1) tenham sido associados às complicações vasculares, o papel exato desses polimorfismos na mediação da fisiopatologia da AF, não está totalmente esclarecido. **Objetivo:** Investigar três polimorfismos do gene EDN1 [rs5370 (G>T), rs1800997 (3A>4A), rs2071942 (G>A)] e avaliar se poderiam estar associados aos marcadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α) na AF. **Material e métodos:** Foram incluídos no estudo 114 pacientes com AF (HbSS) e com idade média de 33 anos, acompanhados no Hemocentro de Pernambuco. Adicionalmente, um grupo controle de 131 adultos (HbAA) e com idade média de 28 anos, da mesma região e com características étnicas semelhantes aos pacientes, foi usado para comparações de frequência. Para a identificação dos três polimorfismos foi usado um ensaio de genotipagem TaqMan (TaqMan[®] SNP Genotyping Assays, Life Technologies) (n = 114), enquanto os níveis dos marcadores inflamatórios foram determinados por Elisa (n = 89). O teste qui-quadrado foi usado para comparar as frequências dos genótipos entre os dois grupos. Para comparação dos níveis dos marcadores inflamatórios entre dois grupos genotípicos em pacientes, foi usado o teste de Mann-Whitney. **Resultados:** As frequências dos genótipos encontrados foram as seguintes: rs5370 (GG, GT e TT foram 69%, 29,2% e 1,8% nos pacientes e 66,9%, 29,9% e 3,1% nos controles, respectivamente); rs1800997 (3A/3A, 3A/4A e 4A/4A foram 57,9%, 33,3% e 8,8% nos pacientes e 58%, 38,2% e 3,8% nos controles, respectivamente); rs2071942 (GG, GA e AA foram 58,9%, 35,7% e 5,4% nos pacientes e 63,3%, 34,2% e 2,5% nos controles, respectivamente). Todas as distribuições genotípicas estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (p > 0,05). Não houve diferença significativa na distribuição dos genótipos dos três polimorfismos entre os grupos de pacientes e de controles (p > 0,05). Não foi encontrada associação entre os polimorfismos rs5370, rs1800997, rs2071942 e os níveis séricos dos marcadores de inflamação (IL-1 β , IL-6 e IL-8) (p > 0,05). Por outro lado, foi observada uma associação entre o polimorfismo rs1800997 e níveis séricos da citocina pró-inflamatória TNF- α , os quais estavam significativamente aumentados nos pacientes com o alelo 4A (genótipos 3A/4A e 4A/4A) quando comparados aos dos pacientes com genótipo 3A/3A (3,63 vs. 1,52 pg/mL, p = 0,03). **Discussão e conclusão:** Estudo prévio associa o alelo 4A do polimorfismo rs1800997 com ao aumento do nível de endotelina-1 (ET-1), que é um polipeptídeo pro-inflamatório em pacientes com hipertensão. Em pacientes com AF, o aumento da produção de ET-1 pode levar à redução da biodisponibilidade do óxido nítrico, consequentemente contribui para a vasoconstrição e o estado infla-

matório. Essas observações são concordantes com o aumento de TNF- α em pacientes com o alelo 4A em comparação aos pacientes com genótipo 3A/3A. Assim, a investigação entre o polimorfismo rs1800997 e os níveis séricos de ET-1 pode auxiliar na compreensão do papel do polimorfismo na vasculopatia e na variabilidade fenotípica observada na AF.

83 PREVALÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NO GENE DA DESIDROGENASE DE GLICOSE-6-FOSFATO (G6PD) EM DOADORES DE SANGUE NO AMAZONAS

Ferreira NS^a, Anselmo FC^a, Albuquerque SRL^a, Fraiji NA^a, Ferreira ACD^b, Bacha TJ^b, Soumanou AG^b, Neto JPM^b

^a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (Hemoam), Manaus, AM, Brasil

^b Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil

Introdução: A desidrogenase da glicose-6-fosfato encontra-se amplamente distribuída entre os tecidos humanos. No entanto, é no metabolismo da hemácia que a G6PD exerce a sua principal função, proteção contra agentes oxidantes. Apesar de os portadores dessa deficiência apresentarem-se como assintomáticos, agentes oxidativos, como alguns fármacos, podem levar ao estresse oxidativo e, por fim, nas hemácias, à hemólise. Há um conhecimento limitado de sua frequência e distribuição precisas na região amazônica. **Objetivo:** Conhecer a frequência da deficiência de G6PD e a prevalência de mutações responsáveis entre os doadores de sangue no estado do Amazonas. **Material e métodos:** Para a metodologia foram selecionados 1.200 doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, 828 homens e 372 mulheres, e a caracterização da G6PD foi feita pela técnica de PCR em tempo real para sete polimorfismos da enzima. Foram identificados 94 doadores de sangue com a deficiência em G6PD, o que corresponde à frequência total de 7,83% e leva à caracterização dos polimorfismos: A- c.202 G>A / c.376 A>G (A-) em 88 casos (7,33%) e 680 G>T / 968 T>C (A-) em 2 casos (0,17%), para a variante Mediterrânea (c.563 C>T) 3 casos (0,25%) e para a variante Chatham (c.1003 G>A) um caso (0,08%). Não foram encontrados portadores das variantes Santamaria (c.542 A>T + c.376 A>G) e Santiago de Cuba (c.1339 G>A), valor encontrado em predominância em mulheres na forma heterozigota. Dos sete polimorfismos encontrados, somente dois não foram identificados na população. **Discussão e conclusão:** No estado do Amazonas, a prevalência de doadores de sangue com deficiência de G6PD não é rara. É necessário considerar a feitura da pesquisa rotineira da atividade de G6PD em doadores de sangue, pois, além da identificação dos indivíduos deficientes, também podemos tentar evitar a transfusão de hemácias com a enzimopatia em pacientes expostos ao risco de uma crise hemolítica.

84 PÚRPURA TROMBOCITOPÊNICA TROMBÓTICA RECIDIVADA: RELATO DE CASO

Marcondes SS^{a,b}, Duarte JSM^b, Silveira MB^b, Aduan MA^b, Prezotti ANL^b, Brunhara LK^a, Lopes GB^a, Lopes MB^a, Cazeli AB^a, Novaes ACZL^a

^a Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), Vitória, ES, Brasil

^b Centro de Hemoterapia e Hematologia do Espírito Santo (Hemoes), Vitória, ES, Brasil

Objetivo: Relatar um quadro de púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) com várias recidivas e relacioná-lo com os tipos de PTT. **Métodos:** Estudo descritivo, retrospectivo, tipo relato de caso. **Relato de caso:** Paciente masculino, 29 anos, sem história familiar de PTT, sem consanguinidade, com antecedente de esquizofrenia e um episódio de PTT em março de 2017 atribuído ao uso de clozapina, o qual fazia uso desde 2006. Tratado com 11 sessões de plasmáfereze em outro serviço e substituída a clozapina por risperidona. Em julho de 2018 apresentou a primeira recidiva da doença (plaquetas 6.000/mm³, Hb: 10,6 g/dL). Na ocasião recebeu infusão de plasma fresco congelado (PFC) por 2 dias, prednisona 1 mg/kg/d e apenas uma sessão de plasmáfereze, evoluiu com recuperação das plaquetas (254mil plaquetas) e estabilização de hemoglobina. O paciente permaneceu em observação intra-hospitalar e, 4 dias após a sessão da plasmáfereze, iniciou com aumento progressivo de DHL (921 e 1.123 UI/L) e queda progres-

9.3. Artigo publicado

Biochemical Genetics
<https://doi.org/10.1007/s10528-020-09959-w>

ORIGINAL ARTICLE



Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Gene Polymorphisms and Markers of Hemolysis, Inflammation and Endothelial Dysfunction in Brazilian Sickle Cell Anemia Patients

F. Chenou, et al. [full author details at the end of the article]

Received: 29 October 2019 / Accepted: 13 March 2020
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

The impaired bioavailability of endogenous nitric oxide (NO) in sickle cell anemia (SCA) may be influenced by polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene (*eNOS*). We compared allelic/genotypic frequencies of the *eNOS* polymorphisms T-786C, VNTR4a/b and G894T between 89 adult SCA patients and 100 healthy controls, and investigated the relationship between these SNPs and markers of hemolysis [lactate dehydrogenase (LDH), indirect bilirubin (IB) and reticulocyte counts], inflammation [interleukins IL-1 β , IL-6, IL-8, Tumor Necrosis Factor (TNF- α) and C-reactive protein (CRP)] and endothelial dysfunction (ED) [soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), soluble L-selectin (sL-selectin), von Willebrand Factor (vWF) antigen and D-dimers] in the patients. The frequencies of the mutant -786C allele and -786C/C genotype were significantly higher in patients ($p=0.02$ and $p=0.04$, respectively) but not significantly correlated with the markers. For VNTR4a/b and G894T, the allelic/genotypic frequencies did not statistically differ between patient and control groups. Patients carrying the 4a allele and those with the 894G/G genotype showed a significant decrease in IB ($p=0.02$ and $p=0.04$, respectively), and only patients with the 4a allele exhibited reduced IL-1 β ($p=0.01$). The correlation profiles between markers of inflammation and ED significantly differed between patients carrying the mutant alleles and those with wild-type genotypes. This appears to be the first report on the relationship between *eNOS* gene polymorphisms and markers of hemolysis, inflammation and ED in Brazilian SCA patients. Our results indicate that the SNPs analyzed may influence the phenotypic variability of these patients.

Keywords Sickle cell anemia · Endothelial nitric oxide synthase · Genetic polymorphisms · Hemolysis · Inflammation · Endothelial pathology

Introduction

Sickle cell anemia (SCA) represents a global public health disorder because of its clinical and epidemiological importance (Sabarensse et al. 2015; Vekilov 2007). In SCA patients, endothelial dysfunction is attributed to impaired bioavailability of endogenous nitric oxide (NO), a potent vasodilator. This impairment is mainly caused by scavenging of NO by cell-free plasma hemoglobin (Mack and Kato 2006). NO is an important regulator of vascular homeostasis that inhibits adhesion, aggregation and recruitment of platelets as well as neutrophil–endothelial interactions (Guzik et al. 2003). It is a product of a two-step oxidation of L-arginine to L-citrulline catalyzed by endothelial nitric oxide synthase (eNOS), a biochemical reaction influenced by several genetic factors (Marsden et al. 1993; Holla et al. 2008). The enzyme eNOS is encoded by the *eNOS* gene located on chromosome 7q35-36, which has 26 exons spanning approximately 21 kb and encodes an mRNA of 4052 nucleotides (Li et al. 2004; Syed et al. 2010). Several polymorphisms have been identified in the promoter region, introns and exons of this gene, three of which are well characterized: *eNOS* –786 T>C in the promoter region, *eNOS* VNTR4a/b, in intron 4, and *eNOS* 894G>T (E298D) in exon 7. The *eNOS* T–786C is a point mutation of thymine to cytosine at nucleotide –786 (rs2070744) in the 5'-flanking region of the *eNOS* gene which could result in a significant downgrading of promoter activity and a significantly reduced NO level (Nakayama et al. 1999). The *eNOS* VNTR4a/b is a variable number of tandem 27 bp repeats in intron 4 which resulted in two alleles: *eNOS* 4b represents the common allele (five 27 bp repeats in intron 4 of the *eNOS* gene) and *eNOS* 4a represents the rare allele (four 27 bp repeats in intron 4 of the *eNOS* gene), and plasma NO levels in homozygous for the rare allele were significantly higher than those homozygous for the common allele (Wang et al. 1997). The G894T is a conversion of G to T at nucleotide position 894 in humans (rs1799983), corresponding to a substitution of glutamate to aspartate at amino acid position 298 (G894T, also called Glu298Asp) in exon 7. This nucleotide substitution affects the efficiency of NO formation, and there is a tendency towards decreased eNOS enzyme activity in *eNOS* 894 T (298Asp) allele carriers compared with the GG homozygotes (Yoshimura et al. 1998). These polymorphisms may affect gene expression and enzymatic activity of eNOS and contribute to vascular inflammation and the development of clinical manifestations in some populations of Sickle Cell Disease (SCD) patients (Yousry et al. 2016; Vilas-boas et al. 2016; Tantanaw et al. 2015; Sharan et al. 2004).

It has been shown that there is substantial interethnic diversity in the distribution of *eNOS* variants (Tanus-santos et al. 2001). Brazil has a highly heterogeneous population with an ethnic composition that varies from region to region (Manta et al. 2013) and SCA is one of the most prevalent hereditary diseases in the country, where approximately 3500 new cases are reported annually (Lervolino et al. 2011; Gomes Lima et al. 2014). Then, it is essential that the role of *eNOS* polymorphisms in SCA be investigated in the Brazilian population.

This study therefore sought to compare the allele and genotype frequencies of three *eNOS* gene polymorphisms (*eNOS* T-786C, *eNOS* VNTR4a/b and *eNOS*

G894T) in a group of SCA patients and a control group. In addition, the study investigated if the polymorphisms and their haplotypes are associated with the markers of hemolysis, inflammation and ED in the patient group.

Patients and Methods

The study was approved by the Research Ethics Committee from the Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco, in the northeast region of Brazil, where the patients are being followed up. All patients and controls signed a voluntary informed consent form before participating in the study.

Study Population

The study population consisted of 89 SCA patients [50 males (56.2%), 29.44 ± 9.22 years old] and 100 healthy HbAA adult volunteers [66 males (66%), 31.05 ± 10.78 years]. The controls were from the same geographic region and of similar ethnic characteristics as the patients. All the patients were in steady state, were not on hydroxyurea therapy and had not received blood transfusions in the three months prior to blood sampling. The diagnosis of SCA (presence of HbS homozygosity) was performed following standard molecular procedures (Sanchaisuriya et al. 2004). Briefly, the samples were submitted to restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of a PCR-amplified fragment of the beta gene (HBB) using *DdeI* enzyme.

Genotype Determination

Genomic DNA of patients and controls was isolated from peripheral blood leukocytes using standard methods (Davis et al. 1986). Genotyping of *eNOS* T-786C and *eNOS* VNTR4a/b was performed by polymerase chain polymorphism-restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) and PCR with FAM-labeled primers, respectively (Leonardo et al. 2015). For the *eNOS* G894T polymorphism, PCR products were sequenced with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The primers, annealing temperatures, restriction enzyme and fragment sizes used were as previously described (Leonardo et al. 2015).

Hemolysis Markers

Serum indirect bilirubin (IB) and lactate dehydrogenase (LDH) concentrations and reticulocyte counts were determined. IB and LDH were quantified with a Cobas Integra plus 400 (Roche, Rotkreuz, Switzerland), and reticulocyte counts were determined with the Coulter STKS hematology analyzer (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA).

Inflammation Markers

Serum levels of C-reactive protein (CRP) and plasma levels of interleukin (IL) 1 β , IL-6, IL-8 and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) were quantified. CRP levels were measured with the N High Sensitivity CRP kit (Dade Behring, Marburg, Hessen, Germany), and cytokine concentrations with ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's recommendations.

Endothelial Dysfunction Markers

The ED markers studied were plasma levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), sL-selectin and von Willebrand Factor (vWF) antigen and serum levels of D-dimers. The first three were measured using ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), and vWF antigen levels were determined as previously described (Gombos et al. 2009). Serum concentrations of D-dimer were quantified with the VIDAS® D-Dimer Exclusion™ kit (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Statistical Analysis

A web tool for SNP analysis (<https://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) was used to determine whether the observed genotype frequencies were consistent with Hardy–Weinberg equilibrium (HWE). *eNOS* gene polymorphism and haplotype frequencies in SCA patients and controls were compared with χ^2 test. Mann–Whitney test was used to compare two groups of *eNOS* genotypes or two groups of haplotypes and quantitative non-parametric variables. Spearman's rank correlation coefficient was used to measure the strength of the linear relationships between two sets of data. Multiple correlation analysis was performed to explore possible correlations between markers of endothelial dysfunction and inflammation in each genotype of the *eNOS* gene. Data analyses were performed with GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and R-statistical language (version 3.2.3; available at <https://www.r-project.org>). Haplotype frequencies were estimated with the EM algorithm (haplo.stats package from R software). Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Results

Allelic, Genotypic and Haplotype Distribution of eNOS Variants in SCA Patients and Controls

Allelic and genotypic frequencies of the *eNOS* T-786C, *eNOS* VNTR4a/b and *eNOS* G894T polymorphisms in patients and controls are shown in Table 1. The genotypes were distributed according to HWE in patients and controls. The only significant

Table 1 Allelic and genotypic frequencies of *eNOS* T-786C, *eNOS* VNTR4a/b and *eNOS* G894T polymorphisms in adult patients with SCA and control subjects

Gene/Genotypes	SCA (<i>n</i> = 89)	Controls (<i>n</i> = 100)	<i>p</i> value
<i>eNOS</i> T-786C			0.04
TT	44 (49.4%)	67 (67.0%)	
TC	38 (42.7%)	27 (27.0%)	
CC	7 (7.9%)	6 (6.0%)	
Alleles			0.02
T	126 (70.8%)	161 (80.5%)	
C	52 (29.2%)	39 (19.5%)	
HWE <i>p</i> value	0.76	0.16	
<i>eNOS</i> VNTR 4a/b			
bb	57 (64%)	63 (63.0%)	0.82
ab	26 (29.2%)	32 (32.0%)	
aa	6 (6.7%)	5 (5.0%)	
Alleles			0.9
b	140 (78.7%)	158 (79%)	
a	38 (21.3%)	42 (21%)	
HWE <i>p</i> value	0.22	0.74	
<i>eNOS</i> G894T			
GG	39 (43.8%)	56 (56.0%)	0.21
GT	43 (48.3%)	36 (36.0%)	
TT	7 (7.9%)	8 (8.0%)	
Alleles			0.19
G	121 (68%)	148 (74%)	
T	57 (32%)	52 (26%)	
HWE <i>p</i> value	0.30	0.52	

Bold values indicate statistically significant ($p < 0.05$)

HWE Hardy–Weinberg Equilibrium

difference observed between the two groups was in relation to the T-786C polymorphism, as the mutant C allele frequency was higher in patients than in controls (29.2% and 19.5%, respectively, $p=0.02$): TT—49.4% vs 67.0%; TC—42.7% vs 27.0%; and CC—7.9% vs 6.0% for patients and controls, respectively ($p=0.04$). Haplotype frequencies of the *eNOS* polymorphisms did not statistically differ between patients and controls (Table 2).

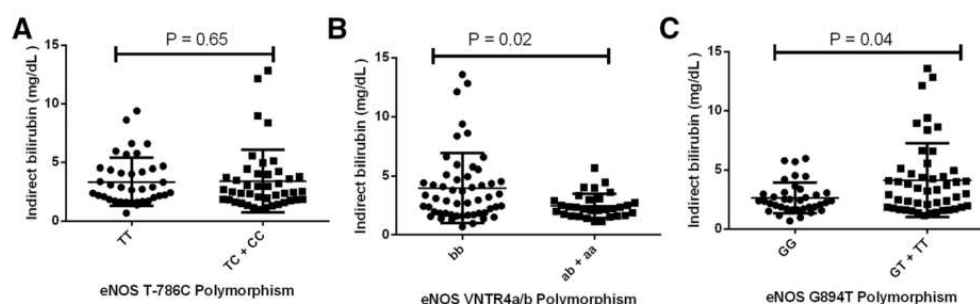
Relationship Between eNOS Genotypes and Markers of Hemolysis, Inflammation and Endothelial Dysfunction in SCA Patients

The association between *eNOS* polymorphisms and markers of hemolysis, inflammation and ED was assessed. Serum levels of IB in the patients with different *eNOS* gene polymorphisms are shown in Fig. 1. There was no significant association between IB and the *eNOS* T-786C polymorphism ($p=0.65$; Fig. 1a; Table 3). Patients carrying the *eNOS* 4a allele had lower IB serum levels than those with the

Table 2 *eNOS* haplotypes frequencies in adult patients with SCA and control subjects

<i>eNOS</i> Haplotypes	<i>eNOS</i> Polymorphism			Haplotypes Frequencies		
	T-786C	VNTR 4a/b	G894T	SCA	Controls	<i>p</i> value
TbG	T	b	G	0.46191	0.50265	0.50
TbT	T	b	T	0.10425	0.13248	0.41
TaG	T	a	G	0.10257	0.17295	0.54
TaT*	T	a	T	0.03914	0.00000	–
CbG*	C	b	G	0.04352	0.02260	0.59
CbT	C	b	T	0.17684	0.13015	0.47
CaG*	C	a	G	0.07177	0.03917	0.23
CaT*	C	a	T	0.00000	0.00000	–
Total	–	–	–	1.0	1.0	–

*Haplotypes group with frequencies <5% (TaT, CbG, CaG and CaT)

**Fig. 1** *eNOS* gene polymorphisms versus IB plasma levels in SCA patients. **a** IB levels versus *eNOS* T-786C. **b** IB levels versus *eNOS* VNTR4a/b. **c** IB levels versus *eNOS* G894T

eNOS 4b/b genotype ($p=0.02$; Fig. 1b; Table 3), while those carrying the *eNOS* 894 T allele had higher IB serum levels than those with the *eNOS* 894G/G genotype ($p=0.04$; Fig. 1c; Table 3).

Among the markers of inflammation, the pro-inflammatory cytokine IL-1 β was associated with the *eNOS* VNTR 4a/b polymorphism; patients carrying the *eNOS* 4a allele exhibited lower IL-1 β plasma levels than those with the *eNOS* 4b/b genotype ($p=0.01$; Fig. 2b; Table 3).

Values of the ED markers for each of the genotypes of the three *eNOS* gene polymorphisms are shown in Table 3. No significant differences were found in these comparisons.

The association between haplotypes and markers of hemolysis, inflammation and ED was assessed. The serum levels of IB was associated with the *eNOS* haplotype TaG (alleles in order of *eNOS* T-786C, *eNOS* 4a/b and *eNOS* G894T); patients carrying this haplotype exhibited lower serum levels of IB than those without this haplotype ($p=0.02$; Table 4).

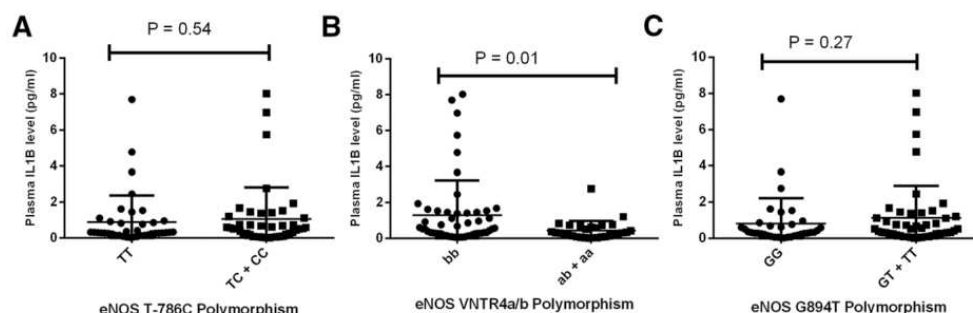


Fig. 2 *eNOS* gene polymorphisms versus IL-1 β plasma levels in SCA patients. **a** IL-1 β versus *eNOS* T-786C. **b** IL-1 β versus *eNOS* VNTR4a/b. **c** IL-1 β versus *eNOS* G894T

Among the markers of inflammation, IL-1 β and IL-6 were associated with the *eNOS* haplotype TaG; patients carrying this haplotype exhibited lower IL-1 β and IL-6 plasma levels than those without this haplotype ($p=0.006$ and $p=0.03$, respectively; Table 4). Additionally, IL-8 was associated with the *eNOS* haplotype TbG; patients carrying this haplotype exhibited lower IL-8 plasma levels than those without these haplotype ($p=0.01$; Table 4).

Correlations Between Markers of Inflammation and Endothelial Dysfunction in SCA Patients

Correlations between markers of inflammation and ED in patients with the wild-type *eNOS* genotype and those carrying the mutant alleles were also evaluated.

eNOS -786 T/C Polymorphism

The correlation pattern between markers of inflammation and ED in patients with the *eNOS* -786 T/T genotype was compared with that of patients carrying the *eNOS* -786C allele. In patients with the *eNOS* -786 T/T genotype, D-dimers were positively correlated with IL-8 and sVCAM, and IL-8 was positively correlated with IL-6 and sVCAM (Fig. 3a). In patients carrying the *eNOS* -786C allele, TNF- α was positively correlated with IL-1 β , vWF and D-dimers. IL-6 was positively correlated with sVCAM, sL-selectin and IL-1 β (Fig. 3b).

eNOS VNTR 4a/b Polymorphism

The correlation pattern between markers of inflammation and ED in patients with the *eNOS* 4b/b genotype was compared with that of patients carrying the *eNOS* 4a allele. In patients with the *eNOS* 4b/b genotype, sVCAM was positively correlated with IL-8 and sICAM, and IL-6 was positively correlated with TNF- α and vWF (Fig. 4a). However, in patients carrying the *eNOS* 4a allele, IL-6 was positively

Table 4 Values of markers of hemolysis, inflammation and endothelial dysfunction in SCA patients with eNOS haplotypes

Variables	^a eNOS haplotype TtG			^a eNOS haplotype TtT			^a eNOS haplotype TaG			^a eNOS haplotype CbT		
	Presence (n=72)	Absence (n=17)	p value ^b	Presence (n=43)	Absence (n=46)	p value ^b	Presence (n=29)	Absence (n=60)	p value ^b	Presence (n=31)	Absence (n=58)	p value ^b
<i>Hemolysis markers</i>												
Lactate dehydrogenase (IU/L)	868 ± 428.55	815 ± 624.40	0.90	863 ± 459.93	865 ± 490.17	0.97	836 ± 556.72	906 ± 436.85	0.30	815 ± 492.65	917 ± 467.72	0.74
Reticulocytes count (%)	8 ± 3.56	8 ± 3.93	0.38	8.05 ± 4.25	8 ± 2.92	0.20	8.45 ± 3.84	8 ± 3.52	0.27	8 ± 3.51	8.20 ± 3.73	0.79
Indirect bilirubin	2.59 ± 5.11	2.99 ± 2.90	0.13	2.97 ± 2.90	2.43 ± 5.95	0.48	2.19 ± 1.59	3.10 ± 5.60	0.02	2.71 ± 2.89	2.59 ± 5.47	0.89
<i>Inflammation markers</i>												
IL-1β (pg/mL)	0.36 ± 1.79	0.52 ± 0.70	0.78	0.42 ± 1.90	0.34 ± 1.30	0.27	0.29 ± 0.30	0.53 ± 1.90	0.006	0.68 ± 2.02	0.30 ± 1.33	0.06
IL-6 (pg/mL)	2.96 ± 2.96	3.43 ± 5.10	0.46	2.98 ± 3.23	3.07 ± 3.76	0.94	2.65 ± 2.28	3.33 ± 3.91	0.03	3.12 ± 5.04	2.98 ± 2.35	0.93
IL-8 (pg/mL)	6.31 ± 6.97	9.79 ± 7.48	0.01	6.90 ± 5.47	7.42 ± 8.42	0.29	6.80 ± 6.44	7.35 ± 7.60	0.72	4.95 ± 7.21	7.48 ± 7.20	0.12
TNF-α (pg/mL)	1.40 ± 1.31	1.18 ± 0.84	0.11	1.34 ± 1.46	1.47 ± 0.96	0.57	1.54 ± 1.09	1.31 ± 1.32	0.77	1.31 ± 1.37	1.47 ± 1.18	0.57
CRP (mg/dL)	0.48 ± 0.59	0.42 ± 0.71	0.99	0.55 ± 0.69	0.45 ± 0.54	0.36	0.53 ± 0.65	0.46 ± 0.60	0.77	0.42 ± 0.78	0.48 ± 0.51	0.66
<i>Endothelial dysfunction markers</i>												
sVCAM-1 (ng/mL)	1009.96 ± 538.19	989.91 ± 504.90	0.28	1065.14 ± 615.52	968.37 ± 416.38	0.21	923.30 ± 560.95	1036.02 ± 516.61	0.21	1018.81 ± 510.42	1000.91 ± 542.24	0.36
sICAM-1 (ng/mL)	230.64 ± 117.24	276.03 ± 181.80	0.35	225.40 ± 147.81	250.38 ± 120.27	0.65	211.69 ± 129.15	253.52 ± 135.69	0.3	228.97 ± 149.85	238.33 ± 125.07	0.68
sL-selectin (ng/mL)	1378.88 ± 301.03	1363.05 ± 272.13	0.94	1343.76 ± 301.85	1407.62 ± 285.32	0.22	1408.61 ± 274.40	1371.12 ± 304.59	0.58	1398.21 ± 308.60	1363.95 ± 288.41	0.92
D-Dimer (mg/L FEU)	1543.52 ± 1483	1455.98 ± 1206.9	0.58	1543.52 ± 1698.5	1521.94 ± 1124.3	0.72	1524.14 ± 1877.6	1523.7 ± 1154.75	0.87	1422.9 ± 1751.4	1538.67 ± 1232.08	0.93
vWF:Ag (%)	157.40 ± 76.69	175.80 ± 92.78	0.22	157.40 ± 70.11	161.70 ± 89.60	0.83	166.40 ± 91.76	158.10 ± 74.01	0.31	158.80 ± 68.45	160.35 ± 86.63	0.8

Bold values indicate statistically significant ($p < 0.05$)

Data are expressed as median ± SD

^aOrder of SNPs in eNOS haplotypes: eNOS T-786C, eNOS VNTR 4a/b and eNOS G894T^bMann-Whitney test

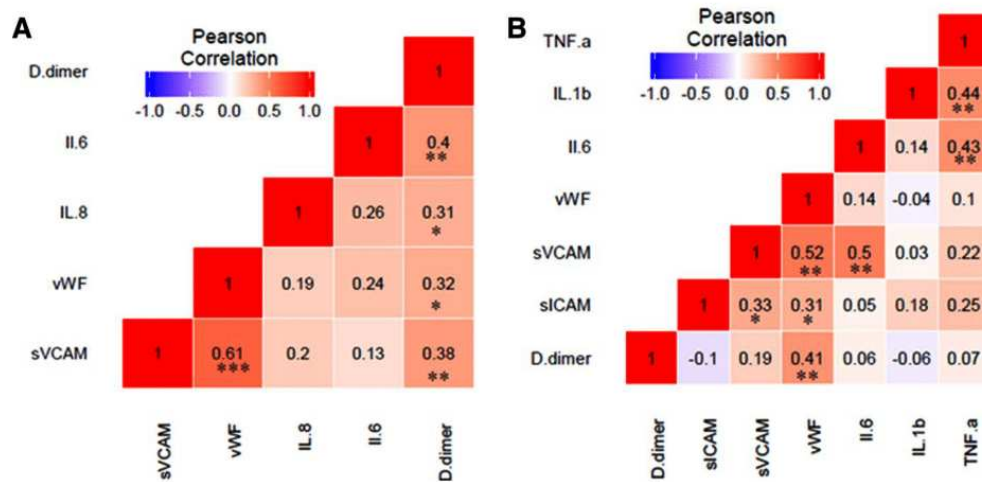


Fig. 3 Heatmap of correlation coefficients between inflammation and endothelial dysfunction markers in SCA patients with the *eNOS* T-786C gene polymorphism. **a** Patients with the *eNOS* -786 T/T genotype. **b** Patients with the *eNOS*-786 T/C and *eNOS*-786C/C genotypes. **p* value < 0.05; ***p* value < 0.01; ****p* value < 0.001

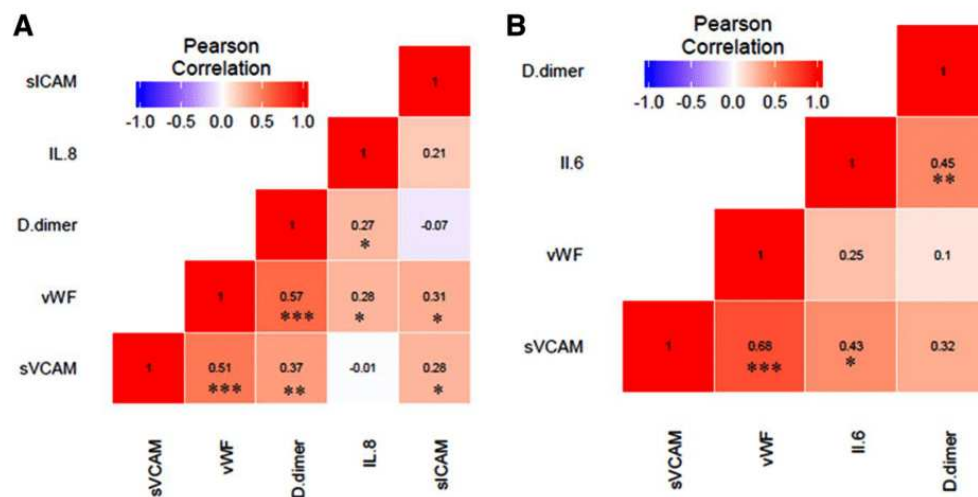


Fig. 4 Heatmap of correlation coefficients between endothelial dysfunction and inflammation markers in SCA patients with the *eNOS* VNTR4a/b gene polymorphism. **a** Patients with the *eNOS* VNTR4b/b genotype. **b** Patients with *eNOS* VNTR4a/b and *eNOS* VNTR4a/a genotypes. **p* value < 0.05; ***p* value < 0.01; ****p* value < 0.001

correlated with sVCAM, IL-8 and D-dimers, IL-8 was positively correlated with D-dimers, and TNF- α was positively correlated with IL-1 β (Fig. 4b).

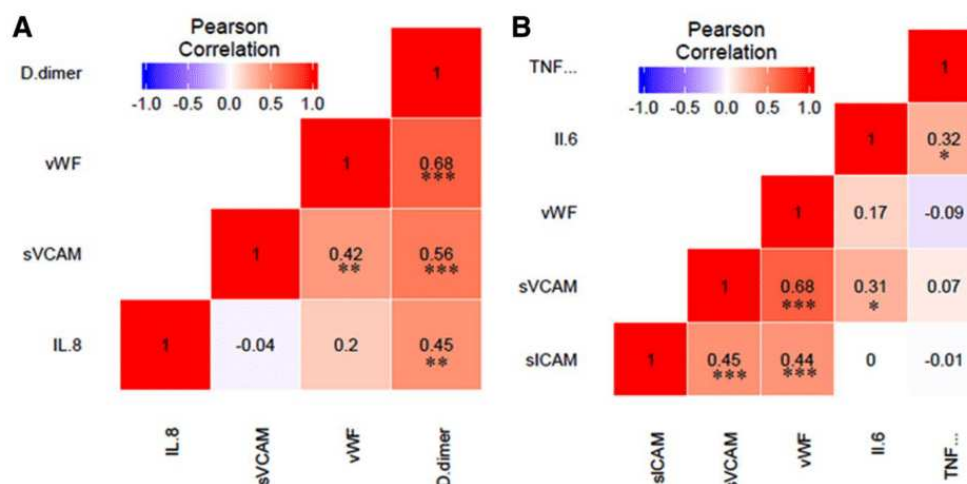


Fig. 5 Heatmap of correlation coefficients between endothelial dysfunction and inflammation markers in SCA patients with the *eNOS* G894T gene polymorphism. **a** Patients with the *eNOS* 894G/G genotype. **b** Patients with *eNOS* 894G/T and *eNOS* 894 T/T genotypes. **p* value < 0.05; ***p* value < 0.01; ****p* value < 0.001

***eNOS* G894T Polymorphism**

The correlation pattern between markers of inflammation and ED in patients with the *eNOS* 894G/G genotype was compared with that in patients carrying the *eNOS* 894 T allele. In those with the *eNOS* 894G/G genotype, IL-6 was positively correlated with IL-8, TNF- α and IL-1 β , and sVCAM was positively correlated with IL-6 and TNF- α (Fig. 5a). In patients carrying the *eNOS* 894 T allele, vWF was positively correlated with sVCAM, IL-6 and sICAM, and sVCAM was positively correlated with sICAM (Fig. 5b).

Discussion

Because of the heterogeneity of the clinical manifestations of SCA, it is essential that the clinical relevance of genetic polymorphisms be investigated. Allelic and genotypic frequencies for the T-786C, G894T and 4a/4b VNTR polymorphisms vary among different populations (Tanus-santos et al. 2001), and there is a dearth of studies on possible associations between these SNPs and markers of hemolysis, inflammation and ED in SCA (Vilas-boas et al. 2016; Tantawy et al. 2015). Hence, this study investigated the allelic/genotypic frequencies of the *eNOS* polymorphisms T-786C, VNTR4a/b and G894T and their correlation with markers of inflammation, hemolysis and ED among SCA patients from a northeastern region of Brazil.

The frequencies of the C allele and CC genotype for *eNOS* T-786C were significantly higher in patients than in controls. This is consistent with the results of Nishank et al. who analyzed Indian SCD patients (Nishank et al. 2013), and contrary

to those of Thakur et al. in Malian SCD patients (Thakur et al. 2014), and Navarro et al. in Afro-Americans (Navarro et al. 2016). The latter two groups found similar allelic and genotypic distributions of T-786C between patient and control groups. Although it has been shown that the CC genotype results in low levels of NO as it decreases *eNOS* mRNA levels (Miyamoto et al. 2000) and impairs NO bioavailability (Yousry et al. 2016), our study did not detect an association between the CC genotype and markers of hemolysis, inflammation and ED in the patients studied.

Allele and genotype frequencies for *eNOS* VNTR 4a/b and G894T did not differ significantly between the patient and control groups. This is similar to the findings of Vargas et al., who studied adult SCD patients from southern Brazil (Vargas et al. 2005). This similarity is interesting given the ethnic heterogeneity of the Brazilian population, which varies from region to region. Thakur et al. (Thakur et al. 2014) and Yousry et al. in Egyptian SCD patients (Yousry et al. 2016) found similar results for *eNOS* VNTR 4a/b, while Armenis et al. in Greek patients (Armenis et al. 2017) found similar results for G894T. On the other hand, Nishank et al. (Nishank et al. 2013) found that allelic and genotypic distributions of these polymorphisms differed significantly between the patient and control groups. These differences may be explained by the variation in the ethnic composition of the populations and/or sample sizes.

The *eNOS* haplotypes distributions did not differ significantly between the patient and control groups. This is similar to the study by Thakur et al. (Thakur et al. 2014) but contrary to that by Nishank et al. (Nishank et al. 2013) who found that the distributions of these haplotypes differed significantly between patient and control groups.

In SCA patients, the reduction in NO bioavailability contributes to the activation of inflammation and vasoconstriction, which in turn reduces blood flow and favors red blood cell sickling (Reiter et al. 2002), thereby worsening chronic intravascular hemolysis. Our patients with the *eNOS* VNTR 4a allele (4a/a or 4a/b) had lower levels of IB than patients with the *eNOS* VNTR 4b/b genotype, and patients carrying the *eNOS* 894 T allele (GT or TT) had higher levels of IB than those with the *eNOS* 894G/G genotype. Zhang et al. (Zhang et al. 2005) showed that the 27 bp repeats in *eNOS* VNTR 4a/b produce small 27 bp siRNA, which may induce significant *eNOS* gene-specific transcriptional suppression by modifying histone acetylation and DNA methylation in regions adjacent to the VNTR itself and in the promoter region thus, serving as an effective negative-feedback regulator of *eNOS* expression (Zhang et al. 2008). It is believed that the *eNOS* 4b allele, which has five times 27 bp repeats, produces more siRNA, resulting in a greater reduction in *eNOS* mRNA levels and decrease in NO production and possibly impairing endothelial function in carriers of this allele. The *eNOS* 894 T variant (GluAsp) results in a reduction of eNOS binding to caveolin-1 and in turn reduces the availability of eNOS for activation. This variant leads to a decrease in eNOS activity and NO production. In fact, decreased eNOS activity has been observed in endothelial cells carrying the *eNOS* 894 T variant (Joshi et al. 2017). These findings may explain the association between IB and the *eNOS* 4a and *eNOS* 894 T alleles in our study.

Patients carrying the *eNOS* 4a allele (4a/a or 4a/b) had lower IL-1 β plasma levels than those with the *eNOS* 4b/b genotype. The association of the *eNOS*4a allele with

higher NO production in SCA patients suggests that its presence may reduce activation of inflammation. Additionally, patients carrying TaG haplotypes had lower IL-1 β and IL-6 plasma levels than those without this haplotype, and those carrying TbG haplotype had lower IL-8 than those without this haplotype. The TaG and TbG haplotypes may be associated with higher NO formation in SCA patients and their presence may reduce activation of inflammation. To our knowledge, this is the first study showing an association between the *eNOS* VNTR 4a/b gene polymorphism and IL-1 β levels; TaG haplotype and IL-1 β and IL-6 levels; TbG haplotype and IL-6 levels in Brazilian SCA patients. Although there was no significant associations with markers of ED, the correlation patterns between the markers of inflammation and ED in patients with homozygous genotypes for wild alleles were significantly different from those observed in patients carrying mutant alleles. These results indicate that *eNOS* polymorphisms may influence the correlation between markers of inflammation and ED, illustrating the multisystemic nature of inflammation and ED in SCA. This suggests that the *eNOS* polymorphisms may contribute to the phenotypic variation and help predict disease progression in these patients.

Funding This study was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Grant No. 2014/00984-3), the Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) and Fundo de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão-FAEPEX / UNICAMP (Brazil).

Compliance with Ethical Standards

Conflicts of interest All authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Ethical approval All procedures followed complied with the ethical standards of the HEMOPE and UNICAMP committee on human research and the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008. The patients and voluntary controls gave their written informed consent for this study.

References


- Armenis I, Kalotycho V, Tzanetea R, Kollia P, Kontogeorgiou Z, Anastasopoulou D, Mantzourani M, Samarkos M, Pantos K, Konstantopoulos K, Rombos I (2017) Prognostic value of T786C and G894T *eNOS* polymorphisms in Sickle Cell Disease. *Nitric Oxide* 62:17–23
- Davis L, Dibner M, Battey J (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, 1st edn. Elsevier, London
- Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik T (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54:469–487
- Gomes Lima RA, Ribeiro Sousa V, Nicolau ID (2014) Trends in mortality and hospital admissions of sickle cell disease patients before and after the newborn screening program in Maranhão. *Brazil Rev Bras Hematol Hemoter* 37:12–16
- Gombos T, Makó V, Cervenak L, Papassotiropoulos J, Kunde J, Hársfalvi J, Föhrécz Z, Pozsonyi Z, Borgulya G, Jánoskúti L, Prohászka Z (2009) Levels of von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity predict clinical events in chronic heart failure. *Thromb Haemost* 102:573–580
- Holla LI, Jurajda M, Pohunek P, Znojil V (2008) Haplotype analysis of the endothelial nitric oxide synthase gene in asthma. *Hum Immunol* 69:306–313

- Joshi MS, Mineo C, Shaul PW, Bauer JA (2017) Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. *FASEB J* 21:2655–2663
- Lervolino LG, Baldin Almeida EP, Picado SM, Calil KB, Viel AA, Campos Freixo AL (2011) Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. *Rev Bras Hematol Hemoter* 33:49–55
- Leonardo DP, Albuquerque DM, Lanaro C, Baptista LC, Cecatti JG, Surita FG, Parpinelli MA, Costa FF, Franco-Penteado CF, Fertrin KY, Costa ML (2015) Association of Nitric Oxide Synthase and Matrix Metalloprotease Single Nucleotide Polymorphisms with Preeclampsia and Its Complications. *PLoS Negl Trop Dis* 10:1–11
- Li R, Lyn D, Lapu-bula R, Oduwole A, Igho-pemu P, Lankford B, Morgan J, Nkemdechi S, Liu G, Pack C, Silvestrov N, Von Deutsch DA, Song Q, Abukhalaf IK, Ofili E (2004) Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in african americans. *Am J Hypertens* 17:560–567
- Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi X-M, Tsui LC, Schappert KT (1993) Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 268:17478–17488
- Manta FSN, Pereira R, Vianna R, Araújo ARB, Gitaí DLG, Silva DA, Wolfgramm EV, Pontes IM, Aguiar JI, Moraes MO, Carvalho EF, Gusmão L (2013) Revisiting the genetic ancestry of brazilians using autosomal AIM-Indels. *PLoS ONE* 8:1–11
- Mack AK, Kato GJ (2006) Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? *Int J Biochem Cell Biol* 38:1237–1243
- Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, Harada M, Kajiyama N, Kishimoto I, Kuwahara K, Hino J, Ogawa E, Hamanaka I, Kamitani S, Takahashi N, Kawakami R, Kangawa K, Yasue H (2000) Nakao K replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a –786T → C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet* 9:2629–2637
- Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y NK (1999) T-786-3eC Mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 99:2864–2870
- Nishank SS, Singh MPSS, Yadav R, Gupta RB, Gadge VS (2013) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with sickle cell disease patients in India. *J Hum Genetics* 58:775–779
- Navarro KG, Agyingi SE, Nwabubobi CK, Thomas BN (2016) Polymorphism of the endothelin-1 gene (rs5370) is a potential contributor to Sickle Cell Disease pathophysiology. *Genes Dis* 3:294–298
- Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, Schechter AN, Gladwin MT (2002) Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 8:1383–1389
- Sabarense AP, Lima GO, Silva LML, Viana BM (2015) Characterization of mortality in children with sickle cell disease diagnosed through the newborn screening. *J Pediatr* 91:242–247
- Syed R, Biyabani MU, Prasad S, Deeba F, Jamil K (2010) Correlation and identification of variable number of tandem repeats of *eNOS* gene in coronary artery disease (CAD). *Saudi J Biol Sci* 17:209–213
- Sharan K, Surrey S, Ballas S, Borowski M, Devoto M, Wang K, Sandler E, Keller M (2004) Association of T-786C eNOS gene polymorphism with increased susceptibility to acute chest syndrome in females with sickle cell disease. *Br J Haematol* 124:240–243
- Sanchaisuriya K, Chunpanich S, Fucharoen G, Fucharoen S (2004) Multiplex allele-specific PCR assay for differential diagnosis of Hb S, Hb D-Punjab and Hb Tak. *Clin Chim acta* 343:129–134
- Tantawy AAG, Adly AAM, Ismail EAR, Aly SH (2015) Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 VNTR polymorphism in sickle cell disease : relation to vasculopathy and disease severity. *Pediatr Blood Cancer* 62:389–394
- Tanus-santos JE, Desai M, Flockhart DA (2001) Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics* 11:719–725
- Thakur TJ, Guindo A, Cullifer LR, Li Y, Imumorin IG, Diallo DA, Thomas BN (2014) Nitric Endothelial Synthase Oxide Polymorphism Gene. *Gene Regul Syst Bio* 8:119–126
- Vekilov PG (2007) Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? *Br J Haematol* 39:173–184

- Vilas-boas W, Figueiredo CVB, Pitanga TN, Carvalho MOS, Santiago RP, Santana SS, Guarda CC, Zanette AMD, Cerqueira BAV, Gonçalves MS (2016) Endothelial Nitric Oxide Synthase (– 786T%3eC) and Endothelin-1 (5665G%3eT) Gene Polymorphisms as Vascular Dysfunction Risk Factors in Sickle Cell Anemia. *Gene Regul Syst Bio* 1:67–72
- Vargas AE, Silva MAL, Silla L, Chies JAB, Chies AB (2005) Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease. *Tissue Antigens* 66:683–690
- Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Wang J, Blangero J, Almasy L, Badenhop RB, Wilcken DEL (1997) Genetic Contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arter Thromb Vasc Biol* 17:3147–3153
- Yousry SM, Ellithy HN, Shahin GH (2016) Sickle Cell Disease Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of vasculopathy in sickle cell disease. *Hematology* 5332:1–9
- Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K (1998) A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet* 103:65–69
- Zhang M, Ou H, Shen YH, Wang J, Wang J, Coselli J, Wang XL (2005) Regulation of endothelial nitric oxide synthase by small RNA. *PNAS* 102:16967–16972
- Zhang M, Zhang C, Shen YH, Wang J, Li X, Chen L, Zhang Y, Coselli JS, Wang XL (2008) Effect of 27nt Small RNA on Endothelial Nitric-Oxide Synthase Expression. *Mol Biol cell* 19:3997–4005

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Affiliations

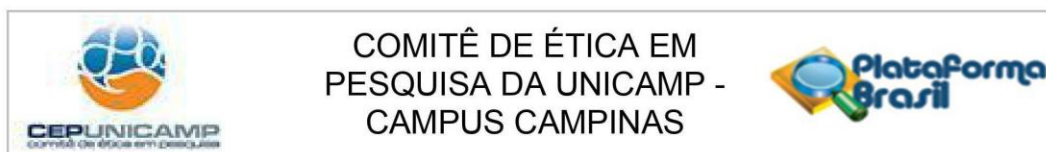
F. Chenou¹ · D. M. Albuquerque² · D. P. Leonardo² · I. F. Domingos³ ·
M. A. C. Bezerra³ · A. S. Araújo⁴ · M. H. S. L. Blotta¹ · F. F. Costa² · M. F. Sonati¹ ·
E. V. Paula² · M. N. N. Santos¹ 

✉ M. N. N. Santos
magnun.nunes@gmail.com

- ¹ Department of Clinical Pathology - School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Rua Vital Brasil 50, Campinas, SP 13083-888, Brazil
- ² Hematology and Hemotherapy Center, State University of Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil
- ³ Department of Genetics, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil
- ⁴ Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco (HEMOPE), Recife, Pernambuco, Brazil

10. ANEXOS

10.1. Parecer do CEP da UNICAMP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DA HAPTOGLOBINA SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE MARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL E HEMÓLISE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Pesquisador: Francine Chenou

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 54930515.0.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.703.176

Apresentação do Projeto:

Resumo:

Vários estudos sugerem que o endotélio vascular encontra-se frequentemente lesado na anemia falciforme (AF), desempenhando papel fundamental na vaso-oclusão que corresponde a um processo complexo e multifatorial. Recentemente, o polimorfismo da haptoglobina (Hp) tem sido investigado como um possível modulador genético da AF. A Hp é uma glicoproteína plasmática cuja função primordial é de se ligar à hemoglobina

(Hb) livre no plasma para prevenir a excreção renal de ferro e os efeitos oxidativos resultantes de sua presença no vaso. Dois alelos codominantes, HP1 e HP2, resultam em 3 genótipos/fenótipos principais, Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2, que correspondem a proteínas com características físico-químicas e funcionais distintas. Em resultados preliminares obtidos pelo nosso grupo em pacientes com AF, observou-se que os genótipos da Hp podem influenciar as concentrações plasmáticas do antígeno do Fator de von Willebrand e se relacionar com o grau de disfunção endotelial. No entanto, estudos adicionais são necessários para maior compreensão desse mecanismo de interação. Dessa forma, o presente estudo tem por objetivos avaliar a relação entre os diferentes genótipos de Hp com marcadores de disfunção endotelial, de hemólise e do estado de hipercoagulabilidade nos

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

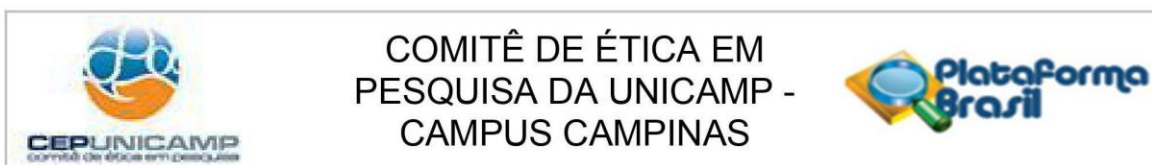
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.703.176

pacientes com AF e observar se os mesmos se correlacionam. Serão incluídos 90 pacientes adultos com AF, pareados por gênero, idade e grupo sanguíneo, em estado estável da doença e sem terapia com hidroxiureia. Os genótipos da Hp dos pacientes serão determinados pela amplificação seletiva dos diferentes alelos. A quantificação dos marcadores de disfunção endotelial, de hemólise e de hipercoagulabilidade serão realizados através de ensaios disponíveis comercialmente de acordo com as instruções dos fabricantes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a relação entre os diferentes genótipos de Hp com marcadores de disfunção endotelial, de hemólise e do estado de hipercoagulabilidade nos pacientes com AF e observar se os mesmos se correlacionam.

Objetivo Secundário:

- Realizar a genotipagem da HP dos pacientes com AF;
- Quantificar e/ou avaliar marcadores de disfunção endotelial: Nível plasmático do FvW:Ag e estudo funcional através de sua atividade de cofator de ristocetina (FvW:RCo); Atividade da enzima ADAMTS13 e níveis circulantes do antígeno da ADAMTS13; Moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM 1); A trombospondina -1 (TSP1); Endotelina-1.
- Mensurar os marcadores de hemólise: A lactato desidrogenase (LDH) sérica; O heme livre; A Hb livre; Contagem de Reticulócitos.
- Avaliar o estado de Hipercoagulabilidade: O complexo trombinaantitrombina (TAT); Fibrinogênio.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

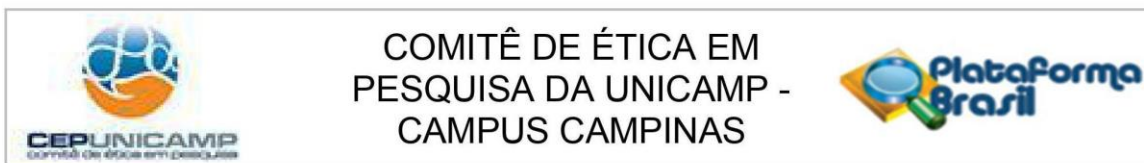
Riscos:

Todo procedimento para coleta de sangue será realizado com material estéril descartável. O risco avaliado para o paciente é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha, podendo ser considerado um procedimento com riscos mínimos.

Benefícios:

Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, a identificação de possíveis influências de um candidato a modulador genético do quadro clínico da anemia falciforme, o que permitirá uma melhor compreensão da fisiopatologia da anemia falciforme.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.703.176

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de doutorado no Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas Universidade de Campinas - Unicamp

Trata-se de um projeto que irá avaliar 90 indivíduos com Anemia Falciforme (AF) e verificar se existem relações entre os diferentes genótipos de Hp com marcadores de disfunção endotelial, de hemólise e do estado de hipercoagulabilidade e observar se os mesmos se correlacionam. Projeto bem elaborado.

Nome da Instituição Co-participante

Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Pernambuco - HEMOPE

Nome do Responsável: Yeda Maia de Albuquerque

Critério de Inclusão:

A pesquisa incluirá 90 pacientes, do sexo masculino, com AF atendidos no Hospital Hemope - Recife/PE, com idade entre 20-40 anos, que não estejam em regime transfusional por três meses, sem terapia com HU e que apresentem as seguintes características moleculares: haplótipo CAR/CAR do cluster da globina betaS (nível similar de HbF) e genótipo alfa normal.

Critério de Exclusão:

Pacientes com outra doença falciforme que não SS, como por exemplo: SC, Sbeta, SD... Pacientes SS em regime transfusional e ou em uso de hidroxiureia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: devidamente preenchida e assinada;

TCLE: adequado;

Comprovante de vínculo: adequado;

Cronograma: adequado;

Orçamento: adequado.

Recomendações:

Não há.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

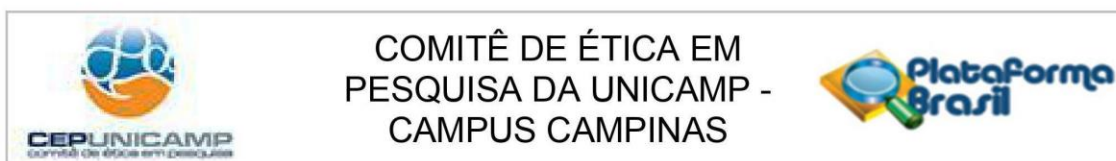
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.703.176

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas pendências anteriores foram devidamente respondidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

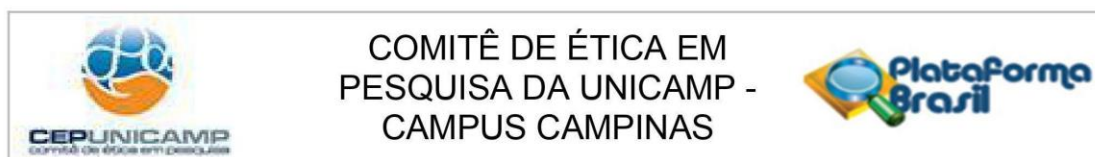
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.703.176

apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_611953.pdf	04/08/2016 13:02:26		Aceito
Outros	COMITERESPOSTAETICA04082016.pdf	04/08/2016 12:59:45	Francine Chenou	Aceito
Outros	Comprovante_matricula.pdf	04/08/2016 12:58:08	Francine Chenou	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE040816.pdf	04/08/2016 12:54:14	Francine Chenou	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	05/06/2016 14:14:02	Francine Chenou	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cartafrancine.pdf	05/04/2016 12:13:43	Francine Chenou	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	22/03/2016 12:51:21	Francine Chenou	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto_Francine.pdf	19/10/2015 17:24:12	Francine Chenou	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 30 de Agosto de 2016

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

10.2. Parecer do CEP do HEMOPE

**FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO ESTADO**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DOS GENÓTIPOS DA HAPTOGLOBINA SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE MARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL E HEMÓLISE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Pesquisador: Francine Chenou

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54930515.0.3001.5195

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.863.428

Apresentação do Projeto:

Projeto de Tese de Doutorado em ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a relação entre os diferentes genótipos de Haptoglobina com marcadores de disfunção endotelial, de hemólise e do estado de hiper coagulabilidade nos pacientes com Anemia Falciforme e suas correlações.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios indiretos promovendo a identificação de possíveis influências de um candidato a modulador genético do quadro clínico da anemia falciforme.

Risco apenas em função da coleta de sangue.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa contribuirá com estudos sobre o endotélio vascular que encontra-se frequentemente lesado na AFe que desempenha papel fundamental na vaso oclusão.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão corretos.

Endereço: Rua Joaquim Nabuco, 171

Bairro: Graças

CEP: 52.011-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3182-4771

Fax: (81)3182-4660

E-mail: cep.hemope@gmail.com

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO ESTADO



Continuação do Parecer: 1.863.428

Recomendações:

Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto Aprovado

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_611953.pdf	04/08/2016 13:02:26		Aceito
Outros	COMITERESPSTAETICA04082016.pdf	04/08/2016 12:59:45	Francine Chenou	Aceito
Outros	Comprovante_matricula.pdf	04/08/2016 12:58:08	Francine Chenou	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE040816.pdf	04/08/2016 12:54:14	Francine Chenou	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_611953.pdf	07/07/2016 22:00:46		Aceito
Outros	CARTARESPOSTA.pdf	07/07/2016 22:00:09	Francine Chenou	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE11.pdf	07/07/2016 01:35:41	Francine Chenou	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_611953.pdf	06/06/2016 11:17:11		Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.pdf	06/06/2016 11:15:26	Francine Chenou	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	06/06/2016 11:14:03	Francine Chenou	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	05/06/2016 14:14:02	Francine Chenou	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_611953.pdf	05/04/2016 12:18:32		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cartafrancine.pdf	05/04/2016 12:13:43	Francine Chenou	Aceito
Declaração de	Biorrepositorio.pdf	22/03/2016	Francine Chenou	Aceito

Endereço: Rua Joaquim Nabuco, 171

Bairro: Graças

CEP: 52.011-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3182-4771

Fax: (81)3182-4660

E-mail: cep.hemope@gmail.com

**FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO ESTADO**



Continuação do Parecer: 1.863.428

Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	12:51:21	Francine Chenou	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	19/10/2015 17:30:30	Francine Chenou	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	19/10/2015 17:29:39	Francine Chenou	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto_Francine.pdf	19/10/2015 17:24:12	Francine Chenou	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 13 de Dezembro de 2016

**Assinado por:
ANA LÚCIA DE SENA
(Coordenador)**

Endereço: Rua Joaquim Nabuco, 171

Bairro: Graças

CEP: 52.011-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3182-4771

Fax: (81)3182-4660

E-mail: cep.hemope@gmail.com

10.3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Resolução 446/12

Título da Pesquisa: Influência dos genótipos da haptoglobina sobre os níveis plasmáticos de marcadores de lesão endotelial e hemólise em pacientes com anemia falciforme.

Nome do Responsável: Francine Chenou

Número do CAAE: 54930515.0.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de um estudo. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Justificativa e objetivos:

Tenho informado que a anemia falciforme é uma doença hereditária que foi trazida há vários anos, principalmente do continente Africano para o Brasil. Descobertas realizadas no campo da biologia molecular estão sendo aplicadas à investigação do mecanismo das síndromes falciformes, que também vem contribuindo para a compreensão clínica dessa doença. O objetivo do referido estudo é avaliar a relação entre os diferentes genótipos de Hp com marcadores de disfunção endotelial, de hemólise e do estado de hipercoagulabilidade nos pacientes com AF, a partir de amostras de soro/plasma.

Procedimentos:

Neste estudo colheremos 26 ml de sangue com o qual realizaremos todas as dosagens e extração o material genético. A coleta será feita quando o senhor (a) vier ao Centro de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) para acompanhamento ambulatorial ou para a coleta de exames solicitados pelo médico. Neste caso, não será feita nenhuma punção extra além da que seria realizada normalmente. Apenas colheremos um pouco de sangue a mais para realização de testes específicos. Seu tratamento não será alterado em nada: não serão adicionados ou retirados medicamentos e todos os outros procedimentos ocorrerão sem nenhuma interferência. O senhor (a) vai participar deste estudo durante um dia.

Riscos e Benefícios:

Todo procedimento para coleta de sangue será realizado com material estéril descartável. O risco avaliado para o paciente é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha, podendo ser

Rubrica do pesquisador: _____ Rubrica do participante: _____

considerado um procedimento com riscos mínimos. No caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o senhor (a) tem assegurado o direito a indenização.

Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, a identificação de possíveis influências de um candidato a modulador genético do quadro clínico da anemia falciforme, o que permitirá uma melhor compreensão da fisiopatologia da anemia falciforme.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

Ressarcimento:

Você tem liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão. A sua participação no projeto não envolverá nenhum custo para você, assim como não haverá nenhum ressarcimento.

Armazenamento de material:

Fui informado ainda que o material biológico coletado será incorporado ao Biorrepositório do Laboratório de Hemoglobinopatias no departamento de patologia clínica da Unicamp, podendo ser utilizado em pesquisas posteriores, que tenham a mesma finalidade do referido estudo, somente após nova consulta ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), onde os meus dados serão preservados quando da publicação dos resultados.

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

O descarte do material armazenado será autorizado nas seguintes situações: material

inadequado para análise devido a contaminação ou descongelamento acidental.

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

(pedir para o participante indicar o nome de uma pessoa a ser contatada).

Rubrica do pesquisador:_____ Rubrica do participante:_____

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com os pesquisadores: Francine Chenou - pesquisador responsável pelo estudo (Lab. de Hemoglobinopatias/ Deptº de Patologia Clínica/FCM/Unicamp ou através do e-mail: franche.2008@hotmail.fr), Prof. Magnun Nueldo Nunes dos Santos - coorientador (Fone: 081 3182-4711 - Lab. de Hemoglobinopatias do Hemope, 019 3521-8960 - Lab. de Hemoglobinopatias/ Deptº de Patologia Clínica/FCM/Unicamp ou 019 99255-8750 / e-mail: magnun.nunes@gmail.com) e/ou com Dr. Aderson da Silva Araujo (Fone: 081 3182-4600 ou 9976-5136), Hematologista do Hemocentro de Pernambuco – HEMOPE.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HEMOPE que fica no endereço: Rua Joaquim Nabuco, 171, Graças, CEP 52011-900 Recife – PE; telefone (81) 3182-4660.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter sido esclarecido sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do(a) participante: _____

_____ Data: ____/____/____.

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

Responsabilidade do Pesquisador:

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

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)

Rubrica do pesquisador:_____ Rubrica do participante:_____

10.4. Autorização da revista Biochemical Genetics

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 26, 2020

This Agreement between UNICAMP -- Francine Chenou ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number 4816280545113

License date Apr 25, 2020

Licensed Content
Publisher Springer Nature

Licensed Content
Publication Biochemical Genetics

Licensed Content Title Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Gene Polymorphisms
and Markers of Hemolysis, Inflammation and Endothelial
Dysfunction in Brazilian Sickle Cell Anemia Patients

Licensed Content
Author F. Chenou et al

Licensed Content Date Apr 10, 2020

Type of Use Thesis/Dissertation

Requestor type academic/university or research institute

Format print and electronic

Portion full article/chapter

Will you be
translating? no

Circulation/distribution 1 - 29

Author of this Springer
Nature content yes

Title EVALUATION OF THE HYDROXYUREA INFLUENCE ON
INTRAVASCULAR HEMOLYSIS, ENDOTELIAL
DISFUNCTION AND HYPERCOAGULABILITY MARKERS IN
PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA

Institution name UNICAMP

Expected presentation
date Jul 2020

Order reference
number N/A

Requestor Location UNICAMP
Rua Júlia Leite de Barros
148
Campinas, SP 13084015
Brazil
Attn: UNICAMP

Total 0.00 USD

Terms and Conditions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH Terms and Conditions

This agreement sets out the terms and conditions of the licence (the **Licence**) between you and **Springer Nature Customer Service Centre GmbH** (the **Licensor**). By clicking 'accept' and completing the transaction for the material (**Licensed Material**), you also confirm your acceptance of these terms and conditions.

1. Grant of License

1. 1. The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, world-wide licence to reproduce the Licensed Material for the purpose specified in your order only. Licences are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to the conditions below.

1. 2. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed Material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of

another entity (as credited in the published version).

1. 3. If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Scope of Licence

2. 1. You may only use the Licensed Content in the manner and to the extent permitted by these Ts&Cs and any applicable laws.

2. 2. A separate licence may be required for any additional use of the Licensed Material, e.g. where a licence has been purchased for print only use, separate permission must be obtained for electronic re-use. Similarly, a licence is only valid in the language selected and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence. Any content owned by third parties are expressly excluded from the licence.

2. 3. Similarly, rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee.

Please apply to

Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com for these rights.

2. 4. Where permission has been granted **free of charge** for material in print, permission may also be granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.

2. 5. An alternative scope of licence may apply to signatories of the [STM Permissions Guidelines](#), as amended from time to time.

3. Duration of Licence

3. 1. A licence for is valid from the date of purchase ('Licence Date') at the end of the relevant period in the below table:

Scope of Licence	Duration of Licence
Post on a website	12 months
Presentations	12 months
Books and journals	Lifetime of the edition in the language purchased

4. Acknowledgement

4. 1. The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licenced Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.

5. Restrictions on use

5. 1. Use of the Licensed Material may be permitted for incidental promotional use and minor editing privileges e.g. minor adaptations of single figures, changes of format, colour and/or style where the adaptation is credited as set out in Appendix 1 below. Any other changes including but not limited to, cropping, adapting, omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author are strictly prohibited.

5. 2. You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.

5. 3. Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP) before publication by Springer Nature, but any Licensed Material must be removed from OAP sites prior to final publication.

6. Ownership of Rights

6. 1. Licensed Material remains the property of either Licensor or the relevant third party and any rights not explicitly granted herein are expressly reserved.

7. Warranty

IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL OR INDIRECT DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

8. Limitations

8. 1. BOOKS ONLY: Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).

9. Termination and Cancellation

9. 1. Licences will expire after the period shown in Clause 3 (above).

9. 2. Licensee reserves the right to terminate the Licence in the event that payment is not received in full or if there has been a breach of this agreement by you.

Appendix 1 — Acknowledgements:

For Journal Content:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Adaptations/Translations:

Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Book content:

Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc)] [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)]

Other Conditions:

Version 1.2

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.