

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

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE HEME E HMGB1 COM OS
MARCADORES DA ATIVAÇÃO DA COAGULAÇÃO EM CRISES AGUDAS NA
DOENÇA FALCIFORME**

EVILÁZIO CUNHA CARDOSO

MANAUS

2019

EVILÁZIO CUNHA CARDOSO

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE HEME E HMGB1 COM OS
MARCADORES DA ATIVAÇÃO DA COAGULAÇÃO EM CRISES AGUDAS NA
DOENÇA FALCIFORME**

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

Orientador: Prof. Dr. Nelson Abrahim Fraiji

Coorientador: Prof. Dr. Erich Vinícius de Paula

MANAUS

2019

Ficha Catalográfica

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

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

C268a Cardoso, Evilázio Cunha
Avaliação da Associação entre os níveis de HEME e HMGB1 com os Marcadores de Ativação da Coagulação em Crises Agudas na Doença Falciforme / Evilázio Cunha Cardoso. Manaus : [s.n], 2019.
70 f.: il., color.; 30 cm.

Dissertação - PGSS - Ciências Aplicadas à Hematologia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.
Inclui bibliografia
Orientador: Fraiji, Nelson
Abrahim Coorientador: Paula, Erich Vinicius de

1. Doença falciforme. 2. heme. 3. dímero D. 4. tromboembolismo. 5. vaso oclusão. I. Fraiji, Nelson Abrahim (Orient.). II. Paula, Erich Vinicius de (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Avaliação da Associação entre os níveis de HEME e HMGB1 com os Marcadores de Ativação da Coagulação em Crises Agudas na Doença Falciforme

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Nelson Abraham Fraiji
Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM
Orientador

Prof.^a Dr.^a Leny Nascimento da Mota Passos
Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM
Presidente

Prof.^a Dr.^a Andreia M.Tarragô
Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM
Membro interno

Prof. Dr. Francisco Erivaldo Vidal Barros
Universidade Federal do Amazonas-UFAM
Membro externo



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS A HEMATOLOGIA - UEA/HEMOAM

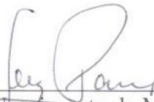


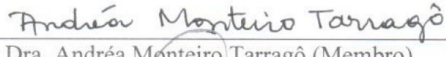
ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 06/2019

Aos dezesseis dias do mês de agosto do ano de 2019, às 09h00, realizou-se na Sala de Aula 10, Bloco E, 1º andar, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM, sito Av. Constantino Nery, 4397 – Chapada, a Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Evilázio Cunha Cardoso**, sob o título “**Avaliação da Associação entre os níveis de HEME e HMGB1 com os Marcadores da Ativação da Coagulação em Crises Agudas na Doença Falciforme**”, em complemento aos critérios exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas a Hematologia, tendo como orientador (a) o Prof(a) Dr(a) **Nelson Abrahim Fraiji**, e coorientador (a) o Prof(a) Dr(a) **Erich Vinicius de Paula**, segundo encaminhamento do (a) Prof(a) Dr(a) **Cristina Motta Ferreira**, Coordenador (a) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas. A Banca examinadora foi composta pelos seguintes membros: Profs. Drs.: Leny Nascimento da Motta Passos (HEMOAM), Andréa Monteiro Tarragô (HEMOAM), Francisco Erivaldo Vidal Barros (UFAM). Encerrando os trabalhos, os examinadores deram o parecer final sobre a defesa, tendo sido atribuído à (o) aluna (o) o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

A Dissertação foi considerada:

Aprovada [] Não Aprovada


Profª. Dra. Leny Nascimento da Motta Passos (Presidente)


Profª. Dra. Andréa Monteiro Tarragô (Membro)


Prof. Dr. Francisco Erivaldo Vidal Barros (Membro)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Manoel Cardoso (*in memoriam*) e Francisca, por suas preocupações, carinho, amor, incentivo de estudar e por sempre acreditarem em mim e terem abdicado de sua vida em prol das realizações e da felicidade de seus filhos.

À minha querida avó Tereza (*in memoriam*), por ter cuidado de mim quando criança e na adolescência, orientando-me quanto às atitudes corretas da vida.

Aos meus irmãos pelo fato de, embora tenham estado distantes, sempre terem acreditado em mim e terem torcido pela realização do meu sucesso.

Aos meus queridos filhos, Kayo e Matheus, por todo amor, incentivo, apoio e compreensão. Sempre farão parte de cada vitória da minha vida. Meus maiores presentes. AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Inicialmente meus agradecimentos a DEUS por toda a proteção, luz, determinação, coragem e direção para alcançar e conquistar as vitórias na minha vida e por colocar pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta dos desafios!

A meus pais, Manoel (*in memoriam*) e Francisca, meu infinito agradecimento. Sei que sempre estive em suas orações com Deus, pedindo minha proteção, saúde e felicidades e acreditando em minha capacidade. Isso só me fortaleceu e me fez tentar não ser o MELHOR, mas sim fazer o MELHOR de mim. Obrigado pelo amor incondicional!

Aos professores, Prof. Dr. Nelson Abrahim Fraiji e Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula, pelas suas orientações, os quais me fizeram enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma dissertação: há uma superação de vida. Vocês foram não somente orientador e coorientador, mas também, em alguns momentos, incentivadores e conselheiros. Vocês foram e são referências profissionais e pessoais para meu crescimento. Obrigado por estarem ao meu lado e por acreditarem tanto em mim.

Aos membros da Banca Examinadora desta pesquisa, Prof. Dr. Nelson Abrahim Fraiji, Prof.^a Dr.^a Leny Nascimento da Mota Passos, Prof.^a Dr.^a Andreia M. Tarragô e Prof. Dr. Francisco Erivaldo Vidal Barros, que gentilmente dispuseram parte do seu precioso tempo contribuindo com minha dissertação para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia. Obrigado pela participação de todos!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, pela dedicação, competência, apoio e todo o conhecimento compartilhado. À Vilmara Batista da Silva, mais que secretária, uma pessoa competente e dedicada no apoio aos discentes do curso de Mestrado.

Aos funcionários da Diretoria de Ensino e Pesquisa, a Dr.^a Myuki Alfaia Crispim e Alessandra Ferreira de Araújo, que sempre me incentivaram e me apoiaram a fazer Mestrado. Muito obrigado!

Ao meu amigo Pedro, aluno de Doutorado da Universidade Federal Amazonas – UFAM, que, no momento mais difícil, se propôs a fazer parte do meu projeto; e, com sua paciência, dedicação e eficiência, ajudou-me na parte laboratorial. Uma pessoa muita envolvida na pesquisa. Obrigado por tudo, Pedro!

Aos meus colegas alunos do Mestrado, pelos momentos em que nos reunimos para estudarmos, somando nossos conhecimentos e ideias para entendermos melhor as atividades repassadas pelos professores. Obrigado! Foi bom poder contar com vocês!

Ao meu cunhado e pastor Francisco Taveira. Mesmo a distância, sei que eu e minha família sempre estivemos em suas orações, nas quais pedia proteção divina. Obrigado, cunhado!

A todos os pacientes portadores da doença falciforme que participaram voluntariamente deste trabalho. Entendendo que, por meio desta pesquisa, pudemos oferecer a vocês um melhor entendimento acerca dessa doença. Por vocês, essa dissertação foi idealizada e se concretizou. Vocês merecem meu eterno agradecimento!

Finalmente, gostaria de agradecer à Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM – e à Universidade Estadual do Amazonas – UEA –, pela parceria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia; em especial à Diretora-Presidente, Dr.^a Socorro Sampaio, pelo incentivo e pelo apoio quando precisei para a liberação das minhas atividades profissionais, no período do curso. Propocionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico; foi uma lição de vida.

Quando queremos, somos capazes; a vitória é a soma dos esforços, repetidos dias após dias; e ninguém vence sozinho!

Obrigado a todos!

RESUMO

Introdução: A doença falciforme (DF) está associada a níveis aumentados de heme extracelular, que tem sido considerado um mediador chave da inflamação nessa condição. Apesar da abundante evidência que sustenta esse conceito em modelos celulares e animais, poucos estudos abordaram a associação dos níveis de heme com a gravidade da doença. **Métodos:** Estudo transversal em pacientes com crise vaso-oclusiva aguda (COV) avaliou a associação entre os níveis de heme total e as características clínicas de COV. Os níveis de heme foram medidos no soro na admissão e, após a convalescença (alta ou primeiro retorno ao ambulatório), foram correlacionados com outros marcadores clínicos e laboratoriais da gravidade da DF. **Resultados:** 28 internações foram incluídas, em 25 pacientes, destes 03 internaram 02(duas) vezes. Os níveis de heme foram semelhantes entre a admissão e a convalescença. Não observamos qualquer associação entre os níveis de heme total com marcadores clínicos, como a duração do COV, o desenvolvimento de síndrome torácica aguda ou o escore de gravidade basal de SDC. Correlações leves a moderadas foram observadas entre os níveis de heme na admissão com marcadores de hemólise, mas não com marcadores ou coagulação (D-dímero) ou inflamação (contagem de plaquetas, neutrófilos, monócitos). **Conclusão:** No curso do VOC, o padrão de variação nos níveis totais de heme no soro é heterogêneo e não se associa com marcadores clínicos e laboratoriais de gravidade ou atividade inflamatória. Esses resultados destacam a importância de refinar os métodos para medir heme livre em matrizes biológicas, de modo que a associação de heme com inflamação e coagulação em SCD possa ser confirmada em estudos em humanos.

Palavras-chave: Doença falciforme, heme, D- dímero, tromboembolismo, vaso-oclusão.

ABSTRACT

Background: Sickle cell disease (SCD) is associated with increased levels of extracellular heme, which has been considered a key mediator of inflammation in this condition. Despite abundant evidence supporting this concept in cell and animal models, very few studies addressed the association of heme levels with SCD severity. **Methods:** This was a cross-sectional study in patients with acute vaso-occlusive crisis (VOC) evaluating the association between total heme levels and clinical characteristics of VOC. Heme levels were measured in serum at admission and after convalescence (discharge or first return visit to outpatient clinic), and correlated with other clinical and laboratory markers of SCD severity. **Results:** Twenty-eight admission were included, in 25 patients. Heme levels were similar between admission and convalescence. We did not observe any association between total heme levels with clinical markers such as VOC duration, development of acute chest syndrome or baseline SCD severity score. Mild to moderate correlations were observed between heme levels at admission with hemolysis markers, but not with markers of coagulation (D-dimer) or inflammation (platelet, neutrophil, monocyte counts). **Conclusion:** In the course of VOC, the pattern of variation in total heme levels in serum is heterogenous, and does not associate with clinical and laboratory markers of SCD severity or inflammatory activity. These results highlight the importance of refining the methods to measure free heme in biological matrices so that the association of heme with inflammation and coagulation in SCD can be confirmed in human studies.

Keywords: Sickle cell disease, heme, D-dimer, thromboembolism, vaso-occlusion

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo fisiopatológico da doença falciforme:	17
Figura 2. Prevalência estimativa de nascimentos vivos com anemia falciforme por 100.000 no mundo.	18
Figura 3: Prevalência percentual da doença falciforme nas regiões Norte e Nordeste, em comparação com as regiões Sul e Sudeste.	19
Figura 4: Proposta para esquema fisiopatológico da anemia falciforme.	20
Figura 5: Heme como ativador da via TLR4 em monócitos/macrófagos.	23
Figura 6: Manifestações clínicas da doença falciforme, divididas em agudas e crônicas.	25
Figura 7: Esquema ilustrando o papel da hemólise intravascular na fisiopatologia dos estados pró-trombóticos observados em pacientes com DF e outras anemias hemolíticas.	28
Figura 8. Esquema geral do estudo	35
Figura 9. Absorbância da curva padrão de HMGB1 medidos no soro de pacientes com doença falciforme na admissão (n = 28) e convalescença (n = 20).	57
Figura 10. Relação da concentração da curva padrão de HMGB1 medidos no soro de pacientes com doença falciforme na admissão (n = 28) e convalescença (n = 20). .	58
Figura 1: Heme levels measured in serum of sickle cell disease patients at admission (n=28) and convalescence (n=20).	43
Figura 2: D-dimer levels measured in serum of sickle cell disease patients at admission (n=28) and convalescence (n=20).	44
Figura 3: Association between heme levels with hospital length of stay (LOS).	44
Figura 4. Heme levels at admission in patients who developed acute chest syndrome (n=7) or only acute pain VOC (n=20). Mann-Whitney test.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Demographic and clinical characteristics of the study population.....	40
Tabela 2. Clinical presentation of acute vaso-occlusive crisis	41
Tabela 3. Hematological parameters during acute VOC	42
Tabela 4. Correlation between heme levels measured at admission with clinical and laboratory parameters.	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Tubos utilizados para coletas das amostras.....	32
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia Falciforme
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DF	Doença Falciforme
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
HB	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina Normal
HBB	Gene β -globina
HBS	Hemoglobina S
HbS	Hemoglobina S
HEME	Grupo Prostático da Molécula da Hemoglobina
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HMGB1	Proteína do Grupo de Mobilidade Elevada 1
LOS	Tempo de Internação Hospitalar
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR	Reação de Cadeia de Polimerase
PPRs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
RDW	Red Cell Distribution Width
SAME	Serviço de Arquivo Médico
DP	Desvio Padrão
STA	Síndrome Torácica Aguda
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEP	Tromboembolismo Pulmonar
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
UNICAMP	Universidade de Campinas – SP
VCM	Volume Corpuscular Médio
VOC	Crise Vaso-Oclusiva
TLR4	Receptor do Tipo Toll 4

RPM Rotação por Minuto

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Anemia falciforme: definição e aspectos gerais	16
2.2 Epidemiologia.....	17
2.3 Fisiopatologia da DF	19
2.4 Heme livre na DF	22
2.5 Apresentação clínica.....	24
2.6 Resposta imune inata em doenças inflamatórias.....	26
2.7 HMGB1 como um DAMP na anemia falciforme	26
2.8 Risco trombótico na anemia falciforme	27
2.9 Moduladores de gravidade e prognóstico na DF.....	28
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Modelo de estudo.....	30
4.2 Aspectos éticos e legais da pesquisa	30
4.3 Local do estudo.....	30
4.4 População de estudo	30
4.5 Coleta e conservação das amostras	31
4.6 Obtenção de dados clínicos	32
4.7 Testes laboratoriais.....	33
4.8 Cálculo do tamanho amostral.....	34
4.9 Análise estatística	34
5 RESULTADO	35
5.1 Artigo Original: Changes in heme levels during vaso-occlusive crisis in sickle cell disease	35
5.2 Quantificação de HMGB1.....	57
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	65
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

9 ANEXOS.....	72
Anexo 1. Termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE.....	72
Anexo 2. Termo de assentimento	77
Anexo 3. Carta de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOAM	79

INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma doença multissistêmica, associada à lesão progressiva de órgãos, e com episódios de crise aguda intercalados. Consiste em uma hemoglobinopatia estrutural, hereditária, cuja base molecular é uma mutação no 17.º nucleotídeo (timina → adenina) do gene da β -globina (*HBB*). Essa mutação dá origem à hemoglobina (Hb) S, cujas características físico-químicas explicam a fisiopatologia da AF (COSTA *et al.*, 2013).

Ao contrário da Hb normal do adulto (HbA), a molécula de HbS possui características estruturais que em condições de baixa tensão de oxigênio favorecem a ligação entre as duas cadeias de β -globina, e a formação de polímeros de HbS. (REES, DC *et al.*, 2010). É esse processo de polimerização da Hb em condições de baixa tensão de oxigênio que dá origem a todo o quadro clínico da AF (REES, DC *et al.*, 2010).

Em muitos pacientes essa alteração está presente em heterozigose, o que resulta em uma condição benigna, sem anemia, conhecida como *traço falciforme*. Por outro lado, muitos pacientes apresentam essa alteração associada (heterozigose composta) a outras hemoglobinopatias (como a hemoglobinopatia C ou as talassemias), o que, de forma geral, caracteriza-se por manifestações clínicas semelhantes à anemia falciforme, porém um pouco mais brandas. O termo “Doença Falciforme” (DF), refere-se ao conjunto de pacientes homozigotos e heterozigotos compostos, excluindo, pois, os pacientes com traço falciforme (COSTA *et al.*, 2013; KEY; DEREBAIL, 2010; WARE *et al.*, 2017).

Segundo dados publicados em um estudo epidemiológico recente, a incidência da anemia falciforme é estimada entre 300.000 e 400.000 recém-nascidos em todo o mundo, com maior prevalência na África subsaariana (KATO, G. *et al.*, 2018; PIEL *et al.*, 2013).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anemia falciforme: definição e aspectos gerais

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia estrutural, hereditária, caracterizada por mutações no gene que codifica a subunidade β de hemoglobina (gene HBB). Essa mutação resulta na troca no aminoácido do ácido glutâmico por uma valina no sexto resíduo da β -globina. Em indivíduos que possuem essa mutação em homozigose, o tetrâmero normal de hemoglobina adulta (α_2/β_2 ; HbA) é completamente substituído por um tetrâmero de hemoglobina pouco solúvel ($\alpha_2/\beta S_2$), a chamada hemoglobina S (HbS), dando origem à anemia falciforme. Ao contrário da hemoglobina (Hb) normal do adulto (HbA), a molécula de HbS, quando assume seu estado desoxigenado, apresenta motivos hidrofóbicos anômalos que favorecem a ligação entre as duas cadeias de β -globina, favorecendo sua cristalização e a formação de um núcleo de polimerização da hemoglobina (REES, DC *et al.*, 2010) (Figura 1). O crescimento desse núcleo preenche o conteúdo da hemácia, comprometendo sua arquitetura e sua flexibilidade e levando à desidratação e ao dano oxidativo dessa célula.

Como consequência, pacientes com DF apresentam anemia hemolítica crônica, laboratorialmente caracterizada por anemia, hiperplasia eritroide na medula óssea, hiperbilirrubinemia e redução da haptoglobina, além de alterações importantes na interação do endotélio com as hemácias, plaquetas e leucócitos (REES, DC *et al.*, 2010).

Em muitos pacientes essa alteração está presente em heterozigose, o que resulta em uma condição relativamente benigna, sem anemia, conhecida como traço falciforme. Por outro lado, muitos pacientes apresentam essa alteração associada (heterozigose composta) a outras hemoglobinopatias (como a hemoglobinopatia C ou as talassemias), o que, de forma geral, caracteriza-se por manifestações clínicas semelhantes à anemia falciforme, porém um pouco mais brandas. O termo “Doença Falciforme” (DF), que se usa neste projeto, refere-se ao conjunto de pacientes homozigotos e heterozigotos compostos, excluindo, pois, os pacientes com traço falciforme (COSTA *et al.*, 2013; KEY; DEREBAIL, 2010; WARE *et al.*, 2017).

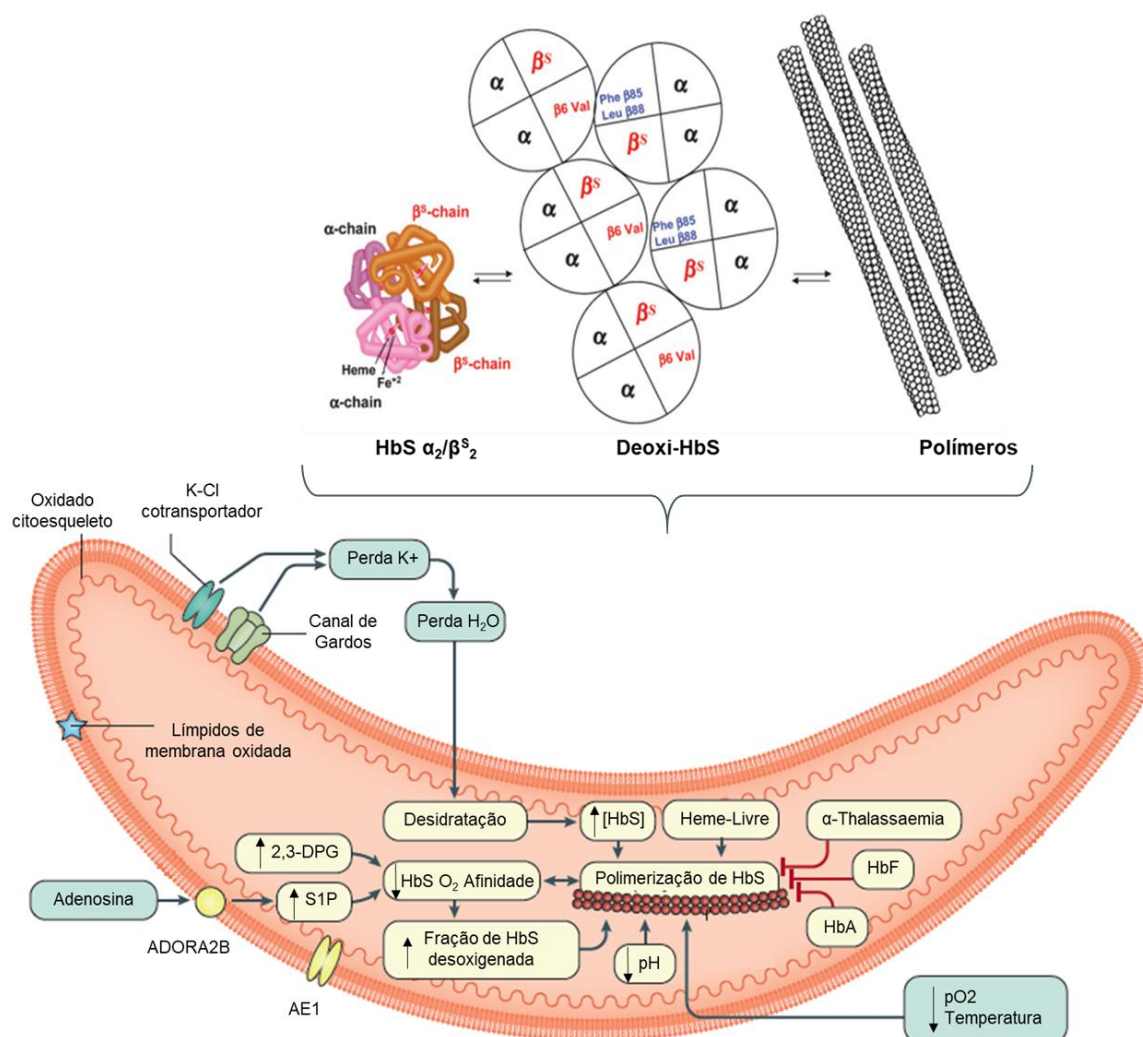


Figura 1. Mecanismo fisiopatológico da doença falciforme: Ciclo que ilustra como as alterações moleculares levam a mudanças físico-químicas que culminam com a polimerização de HbS, que está no centro da fisiopatologia da AF.
Fonte: Adaptado de Kato *et al.*, 2018; Odièvre *et al.*, 2011.

2.2 Epidemiologia

Mundialmente a distribuição geográfica do alelo β^S é descrita por ser impulsionado por dois fatores distintos: a endemicidade da malária em regiões endêmicas e os movimentos migratórios de indivíduos para outras regiões mundiais.

Descrita como uma das áreas mais endêmicas, a África subsaariana é a região com os mais altos níveis de prevalência dessa doença no mundo, apresentando uma frequência estimada de 230.000 nascimentos/ano com essa condição (**Figura 2**). Na América do Sul, segundo uma estimativa realizada em 2008, é observada uma frequência de 2.900 crianças afetadas sob essas condições, além de 1.300 casos de crianças descritas na Europa (PIEL *et al.*, 2017).

Na população brasileira a incidência da DF varia substancialmente entre os estados do País, refletindo a heterogeneidade étnica da população brasileira entre negroides de caucasoides. Existem mais de dois milhões de portadores do gene da doença e mais de 30.000 indivíduos com DF em todo o País, e a prevalência do alelo β^S no Brasil varia de 1,2% a 10,9% dependendo da região, enquanto a prevalência do alelo β^C está entre 0,15% e 7,4% (BRASIL, 2015a; KATO, G. *et al.*, 2018).

Segundo dados publicados, há aproximadamente 1 em cada 650 recém-nascidos no Estado da Bahia, 1 em cada 300 no Estado do Rio de Janeiro e 1 em 13.500 no Estado de Santa Catarina. Isso demonstra que, no ano de 2016, 1.071 dos recém-nascidos foram diagnosticados com doença falciforme; e mais de 60.000 apresentaram alelo heterozigoto (β^S) (CANÇADO; JESUS, 2007; SILVA *et al.*, 2016).

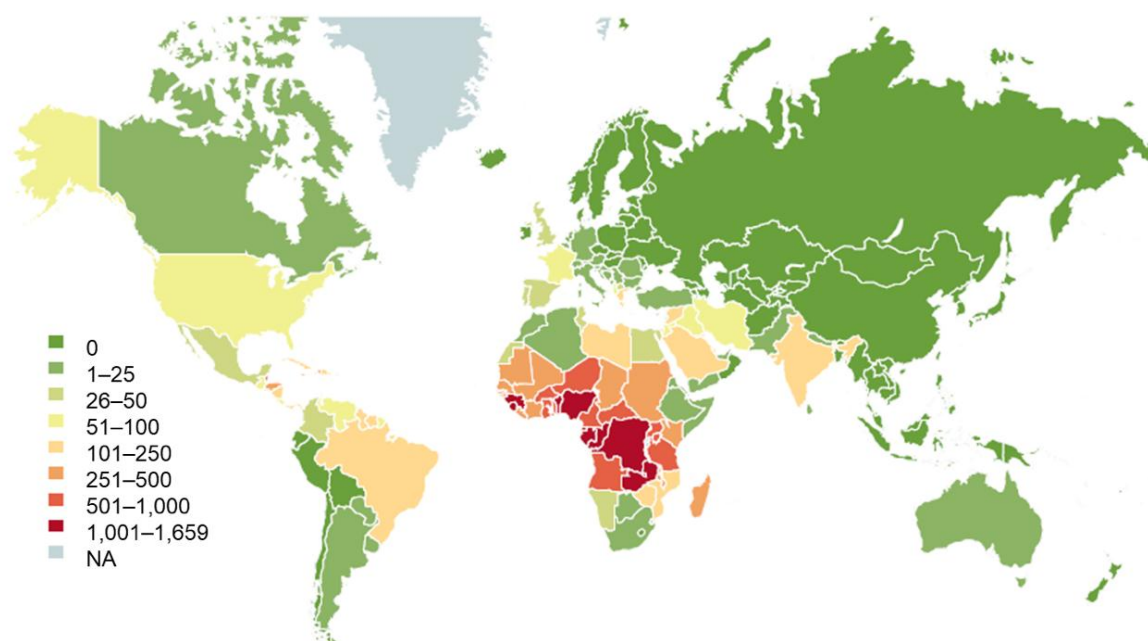


Figura 2. Prevalência estimatimada de nascimentos vivos com anemia falciforme por 100.000 no mundo.

Fonte: Adaptado de KATO *et al.*, 2018.

O número de indivíduos em todas as idades afetadas pela DF em nível mundial é atualmente desconhecido e não pode ser estimado com flexibilidade devido à escassez de dados, em particular dados de mortalidade, em áreas de alta prevalência. Segundo o Programa Nacional de Triagem Neonatal do Ministério da Saúde, a distribuição da DF é heterogênea (BRASIL, 2015b), sendo mais comum na Região Nordeste, seguida das regiões Norte e Sudeste. Na Região Sudeste, a prevalência média de heterozigotos (AS) é de 2%. Esse valor aumenta em cerca de

6 – 8% entre os negros. As menores frequências são descritas na Região Sul. Na Região Norte, a incidência está em 1:2500 no Estado do Pará e em 1:4500 no Acre (BRAGA *et al.*, 2016; BRASIL, 2015a) (**Figura 3**).

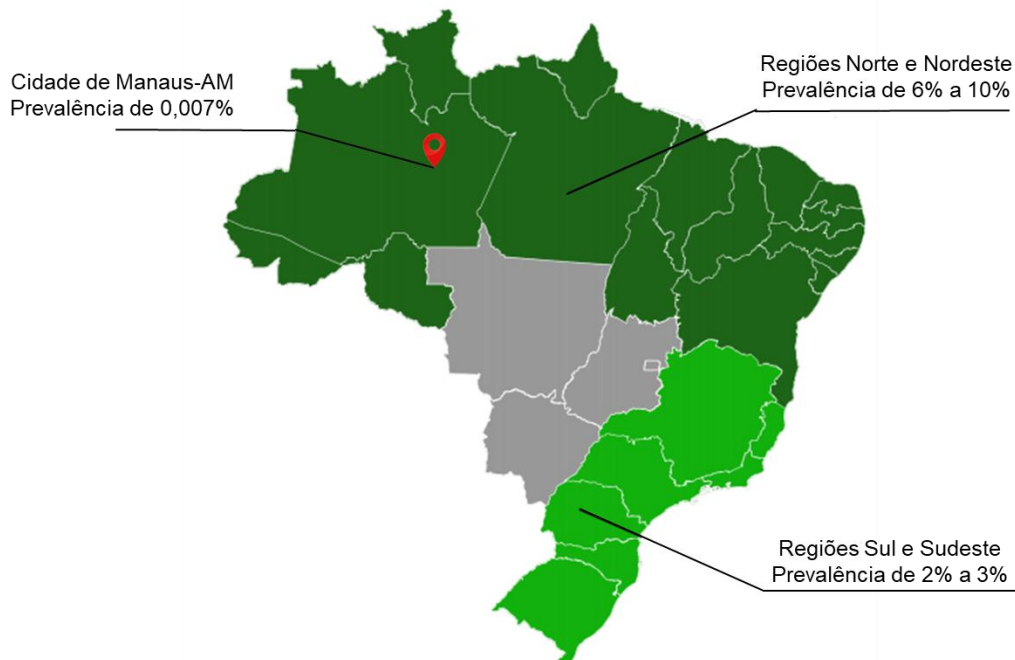


Figura 3: Prevalência percentual da doença falciforme nas regiões Norte e Nordeste, em comparação com as regiões Sul e Sudeste.
Fonte: Adaptado de BRASIL, 2015b.

No Estado do Amazonas dados epidemiológicos ainda são escassos acerca da distribuição epidemiológica de casos da doença. No entanto dados ainda não publicados por nosso grupo de pesquisa revelam que há uma prevalência de aproximadamente 310(trezentos e dez) correspondendo 0,007% de indivíduos portadores de DF da população no Estado do Amazonas.

2.3 Fisiopatologia da DF

2.3.1 O papel da vaso-occlusão

A DF é um distúrbio multissistêmico caracterizado pela presença de eritrócitos anormais provenientes de uma única mutação genética na proteína HbS. Quando desoxigenada, a HbS polimeriza, modificando o eritrócito e causando a perda de cátions, água e aumento na expressão das moléculas de adesão, resultando em anemia hemolítica e uma probabilidade na obstrução dos pequenos vasos sanguíneos, causando vaso-occlusão na microcirculação (**Figura 4**) (NATH; HEBBEL, 2015).

Todavia, sabe-se que a fisiopatologia da vaso-oclusão é muito mais complexa, não sendo causada apenas pela justaposição de hemácias falcizadas, mas também por ciclos repetidos de polimerização e de despolimerização (que ocorrem a cada ciclo circulatório) e que levam à lesão da membrana eritrocitária. Essas lesões na membrana interferem na interação das hemácias com o endotélio e favorecem a ativação de vias inflamatórias (NATH; HEBBEL, 2015). Que envolvem a alteração das interações fisiológicas entre hemácias, leucócitos, plaquetas e células endoteliais, promovendo um aumento na expressão de moléculas de adesão entre essas células (HIGUERA *et al.*, 2014).

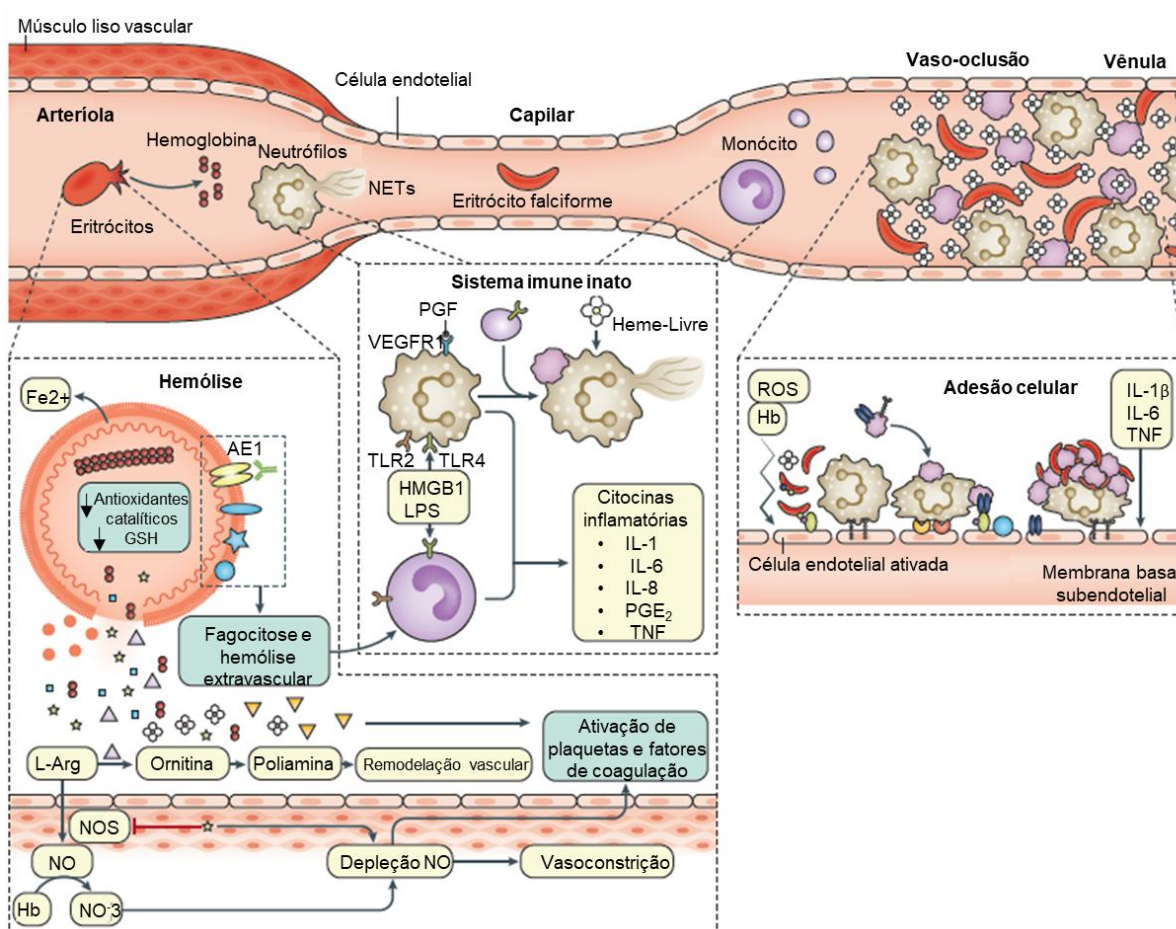


Figura 4: Proposta para esquema fisiopatológico da anemia falciforme.

Com a polimerização da hemoglobina S, ocorrem dois mecanismos fisiopatológicos importantes: hemólise crônica, que resulta na liberação de hemoglobina e heme livres, induzindo a diminuição de NO e a ativação da Imunidade inata. Além disso, há alterações no fluxo da microcirculação por meio da interação entre glóbulos circulantes que aderem um ao outro e ao endotélio ativado, contribuindo potencialmente para processo de vaso-oclusão nas vênulas pós-capilares, favoráveis a processos inflamatórios e protrombótico crônico. **Fonte:** Adaptado de (KATO, G. *et al.*, 2018)

As alterações nessas hemácias ricas em HbS durante sua passagem pelas áreas de baixa tensão de oxigênio na microcirculação (ex. vênulas pós-capilares)

facilitam o processo de vaso-oclusão, ao ativarem a expressão de moléculas de adesão no endotélio e nas próprias hemácias. Em situações extremas, a redução do fluxo ocorre por tempo suficiente para reduzir a entrega de oxigênio aos tecidos e causar isquemia local. Essa isquemia, mesmo que revertida rapidamente, ativa vias inflamatórias e de lesão tecidual que tornam esse microambiente ainda mais propício à ativação da inflamação, em um processo conhecido como “lesão por isquemia e reperfusão”. A redução crônica da entrega de oxigênio aos tecidos causa a lesão progressiva de órgãos observados em pacientes com DF (HEBBEL *et al.*, 2009).

As crises agudas, estas ocorrem quando há uma exacerbação desse processo de lentificação da circulação, com vaso-oclusão completa de partes da microcirculação. Com isso, temos episódios mais agudos de isquemia e inflamação que se expressam como dor, síndrome torácica aguda, entre outras. Em geral, as crises agudas são desencadeadas por situações que reduzem ainda mais a velocidade de trânsito capilar e de oxigênio (como hipoxemia, infecções, desidratação, cirurgias). Os pacientes com DF vivem em uma grande instabilidade, com processos inflamatório crônicos, mas subclínica. Essas situações que lentificam a circulação ou reduzem o oxigênio tecidual perturbam esse equilíbrio instável (chamado de *steady state*), levando às crises de agudização da DF. Por sua arquitetura microvascular sinuosa, a vaso-oclusão é mais frequente na medula óssea, o que explica os frequentes episódios de dor óssea intensa e mal localizada apresentados por esses pacientes, conhecidas como *crises algicas* (COSTA *et al.*, 2013; PIEL *et al.*, 2013; WARE *et al.*, 2017).

2.3.2 O papel da hemólise crônica

Por muitos anos, o impacto atribuído à hemólise no quadro clínico da DF restringiu-se à anemia, em geral bem tolerada pelos pacientes, e à litíase biliar. No entanto uma participação mais importante da hemólise crônica na fisiopatologia das lesões orgânicas progressivas na DF vem sendo descrita, e envolve a liberação de hemoglobina livre na circulação durante a hemólise intravascular (KATO, Gregory J; GLADWIN; STEINBERG, 2007).

Ao estimular a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), a hemoglobina livre leva ao sequestro do óxido nítrico (NO), uma molécula produzida pelo endotélio para regulação do tônus vascular basal, inibição da ativação plaquetária e inibição da expressão de várias moléculas de adesão. A hemólise

também libera a arginase, levando à depleção de arginina, um metabólito essencial para produção de NO. Assim, a depleção crônica de NO leva à disfunção endotelial, além de contribuir para o processo de vaso-oclusão (KATO, Gregory J; GLADWIN; STEINBERG, 2007).

Mais recentemente, a liberação de heme livre, a partir da oxidação de moléculas de Hb livre, passou a ser conhecida como outro mecanismo importante de ativação e perpetuação da inflamação da doença falciforme (BELCHER *et al.*, 2010).

2.4 Heme livre na DF

Heme representa o grupo prostético da molécula de hemoglobina, essencial para sua capacidade de transporte de oxigênio. No entanto sua forma livre é lesiva aos tecidos, causando dano celular por dois mecanismos: (I) um mecanismo direto, mediado por sua capacidade de lesar membranas celulares via radicais livres de oxigênio; e (II) um mecanismo indireto, dependente de sua capacidade de ativar a imunidade inata (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

A circulação de Hb livre, quando não completamente evitada por sua ligação com a haptoglobina, leva à liberação do heme livre. O organismo possui mecanismos eficazes de evitar que isso ocorra, por meio da produção de hemopexina, que se liga fortemente ao heme livre (CHIABRANDO *et al.*, 2014). Entretanto, a capacidade de eliminação de heme livre pela hemopexina é limitada em situações de alta demanda como na hemólise intravascular aguda ou crônica, característica da doença falciforme (MILLER, 2011).

Nos últimos anos, vários estudos mostraram que a ativação da imunidade inata por heme livre pode ser mais um mecanismo que contribui para a manutenção da inflamação na doença falciforme, indicando que heme livre pode atuar como uma alarmina ou DAMP (Padrões Moleculares Associados a Danos) na fisiopatologia do processo de vaso-oclusão na DF. DAMPs são moléculas presentes em células normais que, quando liberadas na circulação (em geral, durante a morte dessas células), são reconhecidas pelo sistema imune inato como um sinal de que em algum lugar do organismo há lesão tecidual ocorrendo. Células do sistema imune inato como neutrófilos e monócitos possuem receptores que reconhecem esses DAMPs e ativam vias destinadas a reparar esse dano. Essas vias incluem a ativação de neutrófilos e a ativação da hemostasia, entre outras. Segundo dados da literatura,

o heme livre é capaz de ativar a imunidade inata por meio da ligação com os receptores toll-like, principalmente o TLR4 (FIGUEIREDO *et al.*, 2007) (**Figura 5**).

Dados publicados no ano de 2013 e 2014 comprovaram que o heme é capaz de desencadear fenômenos vaso-oclusivos em dois modelos animais distintos de anemia falciforme: em modelo de vaso-oclusão de vasos da pele e de síndrome torácica aguda. Ainda nesses estudos, os autores puderam demonstrar que o uso de inibidores de TLR4 e de hemopexina foi capaz de reverter esses efeitos (BELCHER *et al.*, 2014; GHOSH *et al.*, 2013).

Em conjunto, esses dados indicam que o heme livre, por meio de sua interação com o sistema imune inato (atuando, pois, como um DAMP), pode ser um dos mediadores responsáveis pela manutenção da resposta inflamatória na doença falciforme.

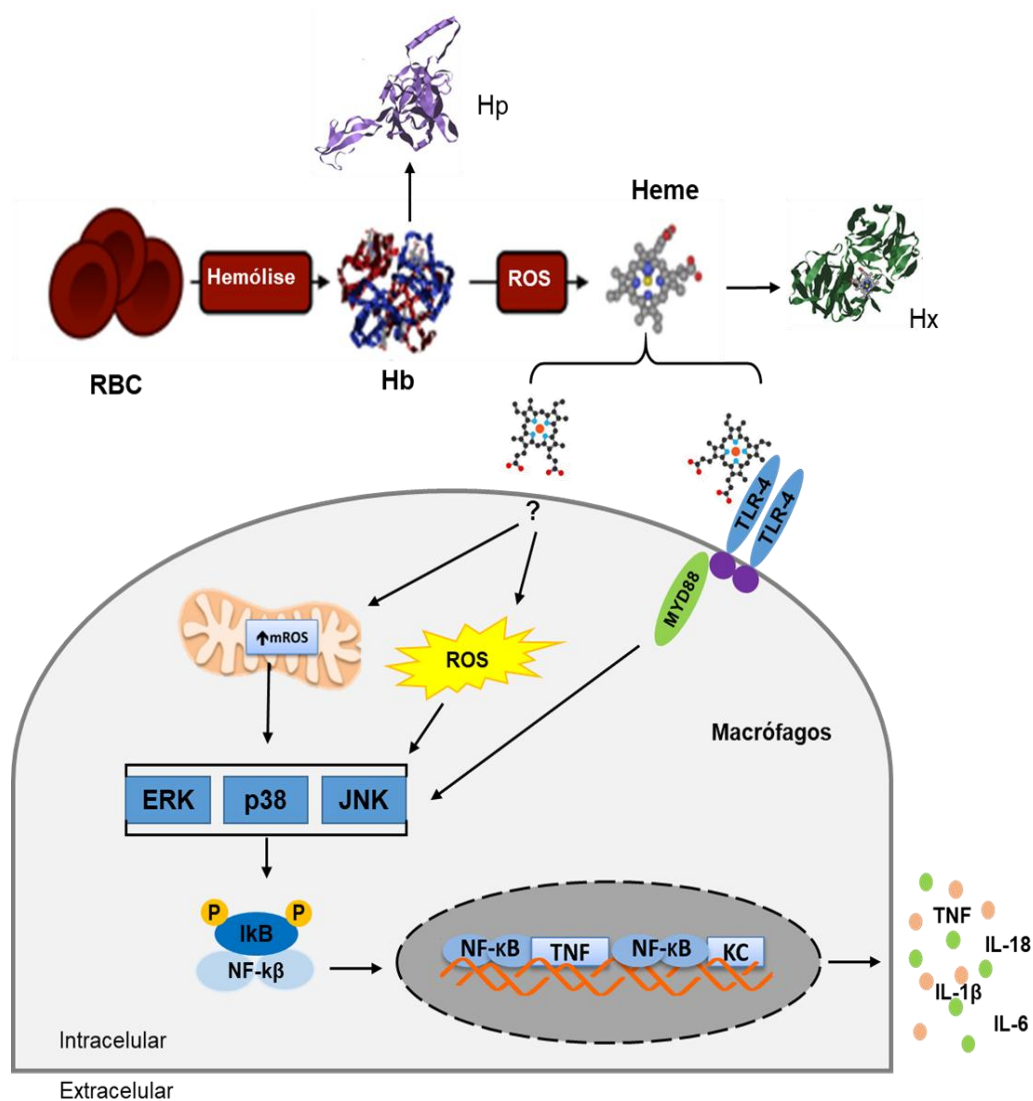


Figura 5: Heme como ativador da via TLR4 em monócitos/macrófagos.

A figura mostra que o heme livre, liberado durante a hemólise, ativa a imunidade inata levando à ativação de vias e aos genes pró-inflamatórios como o TNF, a IL-6, entre outros, por vias como MyD88 e TRIF, que fazem parte da cascata de sinalização ativada pela ligação do heme com receptores TLR4. Há suspeita de que o heme possa atuar por outros receptores ainda desconhecidos, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). **Fonte:** Adaptado de DUTRA; BOZZA, 2014.

2.5 Apresentação clínica

Clinicamente, a DF é uma condição multissistêmica, caracterizada por lesão orgânica crônica e progressiva e por agudizações intermitentes. As agudizações mais frequentes ocorrem sob a forma de crises de dor intensa (crises álgicas). Outra forma importante de agudização é a síndrome torácica aguda (STA), que é a maior responsável por mortes de adultos com DF (CASTRO *et al.*, 1994). A lesão orgânica crônica progressiva da DF reduz de forma muito significativa a qualidade e a expectativa de vida desses pacientes por resultar em complicações debilitantes como as úlceras cutâneas, a necrose asséptica da cabeça do fêmur e a hipertensão pulmonar (COSTA *et al.*, 2013; PIEL *et al.*, 2017; WARE *et al.*, 2017). Do ponto de vista clínico, as manifestações mais conhecidas da DF são as crises álgicas e a STA.

As crises álgicas são as manifestações mais comuns da DF e caracterizam-se por episódios de dor intensa acometendo mais frequentemente a região lombar, o tórax e os ossos longos. Elas variam tanto em gravidade quanto em frequência em diferentes pacientes. Sua ocorrência se inicia logo após os seis meses de vida, de forma que, após o 6.º ano de vida, quase a totalidade dos pacientes com DF já apresentaram esses episódios. Além disso, cerca de 30% dos pacientes apresentam crises álgicas diárias, de modo que grande parte delas acaba controlada no domicílio. Não há exames laboratoriais para o diagnóstico dessas crises, cujo reconhecimento depende essencialmente dos sintomas do paciente. Seu tratamento consiste na identificação e no controle dos fatores desencadeantes (quando presentes), além de hidratação e de analgesia. Crises álgicas graves são aquelas que exigem admissão hospitalar (em geral por mais de 4 horas) e analgesia parenteral. A ocorrência de mais de três crises dolorosas graves por ano identifica pacientes com pior prognóstico (COSTA *et al.*, 2013; REES, DC *et al.*, 2010).

O termo STA é uma definição genérica para qualquer forma de doença pulmonar aguda em pacientes com DF. Formalmente, esta síndrome é definida como a ocorrência, em um paciente com DF, de um novo infiltrado pulmonar

associado a qualquer combinação de febre, dor torácica, taquipneia e/ou tosse ou hipoxemia (CASTRO *et al.*, 1994; MILLER, 2011). A STA perde apenas para as crises vaso-oclusivas em termos de frequência e representa a principal causa de morte em adultos com DF, com taxas de letalidade de cerca de 9% entre adultos, de acordo com um estudo multicêntrico que avaliou 671 episódios (VICHINSKY, E P *et al.*, 1997)

Na **figura 6** são demonstradas as principais complicações crônicas e agudas da DF.

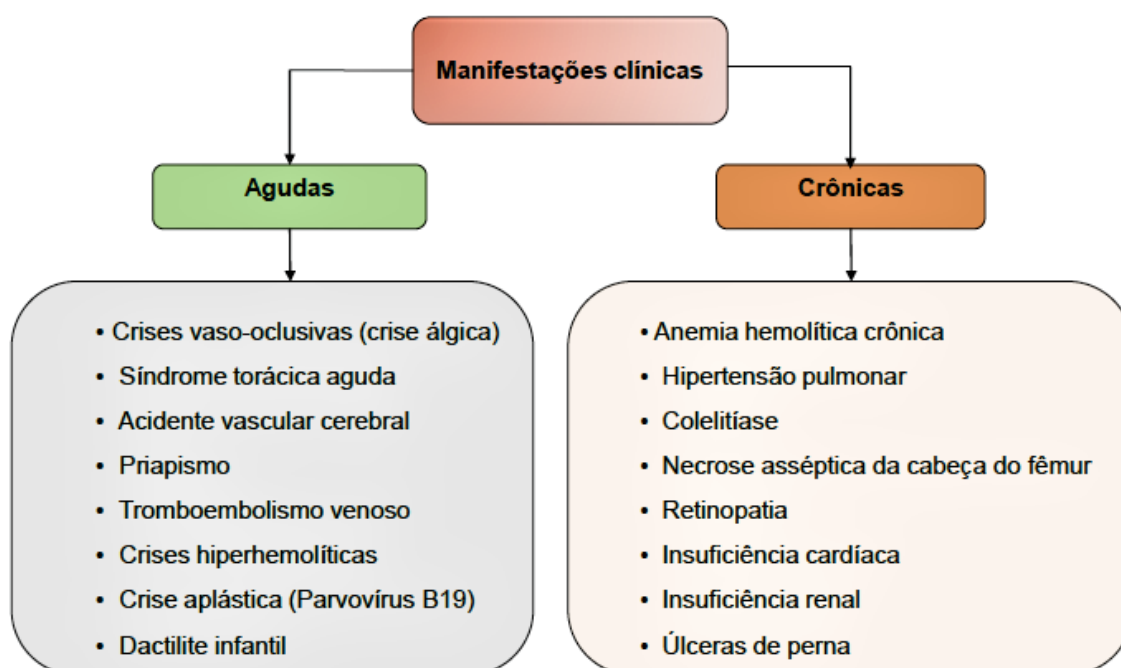


Figura 6: Manifestações clínicas da doença falciforme, divididas em agudas e crônicas.
Fonte: Adaptado de KATO, G. *et al.*, 2018.

Em relação às diferenças clínicas entre a anemia falciforme e a DF, podemos afirmar que os estados homocigotos (anemia falciforme) são caracterizados por manifestações clínicas mais intensas que os estados de heterozigose composta (DF) com talassemia ou com hemoglobinopatia C. Além de menor severidade, algumas diferenças peculiares podem ser mencionadas em subgrupos de pacientes com DF, tais como (I) a presença de microcitose e a tendência à esplenomegalia em pacientes com SB talassemia; (II) os níveis próximos da normalidade da hemoglobina em pacientes com hemoglobinopatia SC; e (III) a maior prevalência de pacientes com hemoglobinopatia SC com retinopatia proliferativa, necrose asséptica da cabeça do fêmur (COSTA *et al.*, 2013; PIEL *et al.*, 2017). O mecanismo

fisiopatológico dessas diferenças é pouco conhecido e não representa o foco desta pesquisa.

2.6 Resposta imune inata em doenças inflamatórias

Praticamente todos os seres vivos desenvolveram mecanismos sensores para a detecção rápida de patógenos invasores ou de lesão tecidual. Em humanos, esses mecanismos fazem parte da resposta imune inata e são representados pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), que detectam padrões moleculares conservados, presentes em bactérias, fungos e vírus, conhecidos como PAMPs (Padrões moleculares Associados a Patógenos), ou nos já citados DAMPs, que se originam de células normais após a lesão (NEWTON; DIXIT, 2012). A ativação desses receptores desencadeia cascatas de sinalização que culminam com o recrutamento de leucócitos, expressão de genes pró-inflamatórios, modificações na função endotelial (ou ativação endotelial) e ativação da hemostasia, que contribuem para a erradicação do patógeno e para o reparo tecidual (CHEN, Grace Y; NUÑEZ, 2010)

A lesão tecidual observada na DF resulta em morte celular e em liberação de diversos DAMPs, que, ao ativarem a imunidade inata, podem contribuir para a perpetuação da inflamação. Entre os DAMPs mais conhecidos na DF, cita-se a Hb livre, o heme e, mais recentemente, o HMGB1.

2.7 HMGB1 como um DAMP na anemia falciforme

Além de heme livre, outra molécula que atua como um DAMP na DF é o HMGB1 (Proteína do Grupo de Mobilidade elevada-1). O HMGB1 é uma proteína que se liga à cromatina que participa da regulação da expressão gênica e da manutenção da estrutura normal do DNA (TSUNG; TOHME; BILLIAR, 2014). Ela é ativamente secretada por células do sistema imune ativadas, além de ser passivamente liberada por células necróticas ou lesadas. Após essa última forma de liberação, ela atua como um DAMP, por ser um forte agonista dos receptores TLR4. Recentemente foi demonstrado que os níveis de HMGB1 encontram-se aumentados na DF e que esse aumento é ainda mais intenso durante as crises de falcização (XU *et al.*, 2014)

2.8 Risco trombótico na doença falciforme

Uma complicação clínica pouco discutida na DF é a trombose venosa profunda. Eventos tromboembólicos venosos possuem incidência elevada na DF, com destaque para o tromboembolismo pulmonar (TEP) (NAIK *et al.*, 2014). Estudos prospectivos recentes mostram que o risco de TEP em pacientes com DF é cerca de cinco vezes maior que indivíduos portadores da trombofilia hereditária Fator V Leiden (NAIK *et al.*, 2014) e que mesmo indivíduos com traço falciforme apresentam risco elevado de tromboes venosas (FOLSOM *et al.*, 2015). Por esse motivo, a fisiopatologia da hipercoagulabilidade na DF tornou-se objeto de grande interesse nos últimos anos.

Do ponto de vista de caracterização desse problema, já foi demonstrado que praticamente todos os compartimentos da hemostasia estão hiperativados nesses pacientes, tendenciado a hipercoagulabilidade. Essas alterações – que representam as consequências, e não as causas da hipercoagulabilidade – foram muito bem descritas nos últimos anos. No entanto bem menos se sabe sobre os mediadores que iniciam e perpetuam a ativação da coagulação na DF. Em outras palavras, mais importante do que demonstrar evidências laboratoriais da hipercoagulabilidade na DF, o que já foi feito por outros autores, entendemos ser importante estudar mecanismos que podem ser os responsáveis por causar essa hipercoagulabilidade. Como veremos, a liberação de DAMPs pode ser uma dessas causas (COLELLA *et al.*, 2012; LIM; ATAGA; KEY, 2013)

Dentre as possíveis causas de hipercoagulabilidade já estudadas na DF, dois mecanismos merecem destaque por serem os mais conhecidos e estudados: (1) a exposição de fosfatidilserina na membrana da hemácia, que leva à ativação da coagulação, e (2) a hemólise. O primeiro consiste na exposição de um grupo de fosfolípídeos (fosfatidilserina), que normalmente ficam na parte interna da membrana. Os ciclos de polimerização e de despolimerização levam a essa exposição. A exposição da fosfatidilserina é capaz de ativar a cascata da coagulação, o que explica parte da hipercoagulabilidade. Já a contribuição da hemólise para a hipercoagulabilidade parece estar relacionada à liberação de Hb livre no plasma, que, por meio do sequestro de óxido nítrico, favorece a hipercoagulabilidade. É sabido que o óxido nítrico possui importante ação anticoagulante (vasodilatador, inibidor de ativação plaquetária, entre outros). O seu consumo leva à redução desse efeito anticoagulante. Além disso, a Hb livre, quando

não ligada à haptoglobina, libera heme livre, que pode estar relacionado à ativação da coagulação (**Figura 7**).

No entanto, as evidências que ligam o heme livre à ativação da coagulação ainda são escassas (DE SOUZA *et al.*, 2017; SPARKENBAUGH, E; PAWLINSKI, 2013). Além disso, a relação entre o HMGB1 e a ativação da coagulação nunca foi estudada. Nesse contexto, a proposta da nossa pesquisa é avaliar se a presença de heme e de HMGB1 pode representar um mecanismo causador da ativação da coagulação na DF.

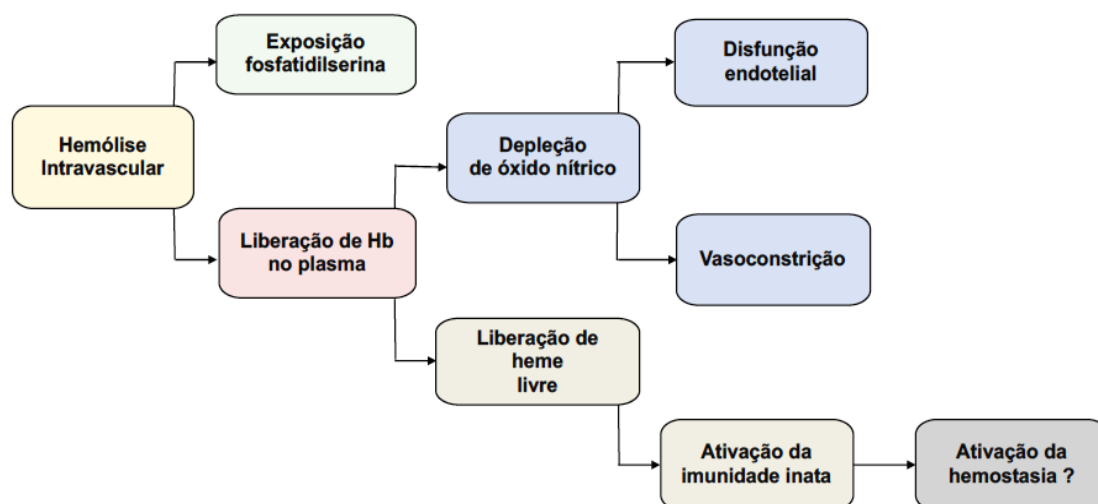


Figura 7: Esquema ilustrando o papel da hemólise intravascular na fisiopatologia dos estados pró-trombóticos observados em pacientes com DF e outras anemias hemolíticas.

Fonte: Adaptado de GLADWIN; KATO, 2008.

2.9 Moduladores de gravidade e prognóstico na DF

Diversos marcadores prognósticos e moduladores de gravidade da DF já foram identificados. Os mais conhecidos são a dosagem de Hb fetal e a herança conjunta da alfa-talassemia. O mecanismo pelo qual essas duas alterações resultam em quadros clínicos mais brandos está provavelmente relacionado ao fato de ambas reduzirem a quantidade de HbS dentro de cada hemácia, reduzindo assim a tendência à polimerização (PIEL *et al.*, 2013). Outro marcador prognóstico importante são os haplótipos associados à mutação no gene *HBB*, que também identificam grupos com gravidade distinta (SANTANA *et al.*, 2016).

No entanto, em relação ao objeto deste estudo, que é o risco aumentado de eventos tromboembólicos em pacientes com DF, nenhum desses três marcadores encontra-se associado a esse risco, tampouco são conhecidos outros marcadores prognósticos que identificariam pacientes sob maior risco, sendo a essa segunda situação um dos objetivos deste estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar os níveis circulantes de heme e HMGB1 nas crises vaso-oclusivas da DF e sua associação com outros marcadores de hemólise, ativação da coagulação e da resposta inflamatória.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever os níveis circulantes de heme e HMGB1 em crises vaso-oclusivas (álgicas e STA) na admissão e após a convalescença de pacientes com DF.
- Descrever os níveis circulantes de marcadores de ativação da hemostasia (D-dímero, plaquetas), hemólise (reticulócitos e variação na concentração de hemoglobina) e da resposta inflamatória (leucócitos, neutrófilos e plaquetas) de paciente com DF em crise vaso-oclusiva na admissão e após a convalescença.
- Investigar a associação entre os níveis de heme e HMGB1 com os marcadores laboratoriais e clínicos em pacientes com DF em crises álgicas e após a convalescença.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo de estudo

Trata-se de um estudo descritivo, transversal, exploratório, realizado para descrever os níveis circulantes de dois DAMPs (HMGB1 e heme) e para avaliar sua associação com outros marcadores clínicos e laboratoriais em pacientes com DF em crises vaso-oclusivas (álgicas e/ou STA).

4.2 Aspectos éticos e legais da pesquisa

Este projeto de pesquisa foi apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM), por meio de parecer aprovado em 30 de janeiro de 2018, CAAE: 71147817.3.0000.0009, de acordo com o que determina a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, a qual preconiza as diretrizes e as normas regulamentares da pesquisa envolvendo seres humanos. Nenhuma atividade do estudo foi iniciada sem a assinatura do TCLE pelos sujeitos do estudo.

4.3 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)/Laboratório Genômica), em colaboração com o Hemocentro de Campinas – UNICAMP.

4.4 População de estudo

A população de estudo foi constituída por indivíduos com diagnóstico confirmado de DF de ambos os sexos, com idade entre dez e 60 anos, admitidos na unidade de emergência da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) com diagnóstico clínico de crise algica grave e/ou STA por demanda espontânea entre maio de 2018 e abril de 2019.

Critérios de inclusão:

- Diagnóstico confirmado de DF.
- Diagnóstico de crise álgica grave e/ou STA.
 - *Crise álgica grave*: o diagnóstico de crise álgica em paciente com DF foi feito com base em critérios clínicos classicamente usados, que consistem na presença de dores em região lombar, quadril, óssea, articular ou abdominal, sem outra causa óbvia, e cujo quadro álgico seja reconhecido pela equipe médica como crise álgica; a caracterização da crise como grave exigiu que o paciente tenha sido admitido na unidade de emergência por pelo menos quatro horas e que tenha necessitado de uso de medicação analgésica parenteral (KEIKHAEI *et al.*, 2013).
 - *Síndrome torácica aguda (STA)*: definida pela ocorrência de um novo infiltrado pulmonar (caracterizado pela alteração na ausculta ou na radiografia de tórax) em um paciente com DF apresentando, concomitantemente, um ou mais dos seguintes sinais/sintomas: febre, dor torácica, taquipneia, tosse ou hipoxemia (SINS *et al.*, 2017).

Critérios de exclusão:

- Presença de instabilidade hemodinâmica.
- Uso de duas ou mais unidades de concentrado de hemácias na mesma internação antes da coleta da amostra.
 - Admissão acima de 48 horas do momento da coleta da amostra.
 - Ausência de acesso venoso para coleta de amostras.
 - Idade < 10 anos.
 - Indígenas.
 - Gestações.

4.5 Coleta e conservação das amostras

As amostras analisadas neste estudo foram coletadas antes das primeiras 48 horas da admissão dos pacientes na unidade de emergência, após assinatura do TCLE, mediante punção venosa ou cateter venoso central, de sorte que, nesse caso, um volume inicial de 2mL foi descartado. Utilizamos a técnica descrita nos procedimentos operacionais padrão da instituição, observando o mínimo de garroteamento e de traumas necessários.

Além disso, realizamos uma coleta adicional após a convalescença (pré-alta), ou no primeiro retorno ambulatorial. Essas coletas da convalescença foram realizadas preferencialmente durante a coleta de outras amostras de rotina (nos retornos ambulatoriais) e antes da realização de procedimentos de eritrocitaférese ou transfusão.

Imediatamente após a coleta, os tubos foram encaminhados para o laboratório de genômica da Fundação HEMOAM para processamento. Apenas o tubo para realização do hemograma foi direcionado para o laboratório de análise clínicas e hematológicas, para realização do hemograma e contagem de reticulócitos. A distribuição de tubos de coleta é mostrada no **Quadro 1**.

Quadro 1: Tubos utilizados para coletas das amostras

Pacientes acima de 35kg	Pacientes com menos de 35kg
03 tubos, totalizando 11,5ml	03 tubos, totalizando 9,0ml
01 tubo de EDTA (3,0)ml para realização de hemograma com reticulócitos	01 tubo com EDTA (2,0)ml para hemograma com reticulócitos
01 tubo seco (4,0)ml para obtenção de soro	01 tubo seco de (4,0)ml para obtenção de soro
01 tubo com anticoagulante citrato (4,5)ml para obtenção de plasma	01 tubo com anticoagulante citrato (3,0)ml para obtenção de plasma

Para obtenção de plasma para testes de coagulação, os tubos com o anticoagulante citrato de sódio 3,2% foram centrifugados a 1200g (3.000 a 3.500) rotação por minutos em centrífuga refrigerada a 4° C por 15min. Para obtenção do soro, o sangue coletado em tubo seco foi deixado para coagulação em temperatura ambiente por 30min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4° C por 10min a 800g (1.000 RPM) rotação por minutos. Alíquotas de 400uL foram armazenadas em biorrepositório, localizado no Laboratório de Genômica do HEMOAM, cujo regulamento foi inserido na submissão ao Comitê de Ética. Quando necessário, as amostras, acondicionadas em gelo seco, foram enviadas a laboratórios de apoio.

4.6 Obtenção de dados clínicos

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos de forma codificada para preservar a identidade dos sujeitos, a partir dos prontuários físicos e eletrônicos do HEMOAM, por meio do Serviço de Arquivo Médico (SAME).

Também foram obtidos dados relativos ao escore de gravidade da DF, de um estudo anterior do grupo. Trata-se de um escore validado internacionalmente, que

considerada diversas variáveis clínicas e laboratoriais, em pacientes fora de crise (SEBASTIANI *et al.*, 2007). Dessa forma, trata-se de uma estimativa da extensão das lesões da DF em cada paciente. O escore foi calculado cerca de 12 meses antes do estudo por outro pesquisador do HEMOAM, que cedeu os resultados para nossa análise. Os dados já se encontram publicados (CESAR *et al.*, 2019).

4.7 Testes laboratoriais

4.7.1 Dosagem de D- dímeros

A dosagem de D- dímeros presentes nas amostras de plasma com anticoagulante citrato foi realizada a partir do *kit* comercial (*Kit* D-Dimer Humano ELISA), que consiste em um teste imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) usado para medição quantitativa dos produtos de degradação da fibrina D-Dímeros por ensaio imunoenzimático. O teste emprega um anticorpo de captura marcado, um anticorpo detector conjugado que capta o analito da amostra em solução. A fluorescência emitida é resultado de uma série de reações e é proporcional à quantidade de antígenos presentes na amostra; e a intensidade é medida a 450nm. As dosagens do dímero D, para este estudo, foi feitas por meio de colaboração com o laboratório de hemostasia e inflamação do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp, Campinas, SP.

4.7.2 Dosagem de Heme

A dosagem de Heme presente no soro foi realizada a partir do *kit* comercial (QuantiChrom™ Heme da BioAssay Systems), que consite em um teste colorimétrico. O método baseia-se em uma solução aquosa alcalina melhorada, em que o heme é convertido em uma cor uniforme. A intensidade da cor, medida a 400nm, é diretamente proporcional à concentração de heme presente na amostra. O método dosa o heme total no soro, não sendo capaz de diferenciar o heme livre do heme ligado a proteínas (hemopexina, albumina, entre outros). As dosagens foram realizadas em colaboração com o laboratório de hemostasia e inflamação do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp, Campinas, SP.

4.7.3 Dosagem de HMGB1

A dosagem de HMGB1 presente no soro foi realizada a partir do *kit* comercial, que consiste em um teste imunoenzimático ELISA, usado para medição quantitativa da proteína HMGB1. O teste emprega um anticorpo de captura marcado, um anticorpo detector conjugado que capta o analito da amostra em solução. A

fluorescência emitida é resultado de uma série de reações e é proporcional à quantidade de antígenos presentes na amostra; e a intensidade é medida a 450nm, conforme as orientações do fabricante. As dosagens foram realizadas em colaboração com o laboratório de hemostasia e inflamação do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp, Campinas, SP.

4.7.4 Contagem de plaquetas e reticulócitos

Foi realizada em contador hematológico automatizado modelo ADVIA 2120, do fabricante Siemens Healthcare, no laboratório de Hematologia do HEMOAM.

4.8 Cálculo do tamanho amostral

O tamanho amostral foi calculado utilizando uma *ferramenta on-line* da Universidade da Colúmbia Britânica no Canadá (<https://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/>). Para demonstração de uma diferença da ordem de 1 desvio-padrão entre os grupos, foi necessário um tamanho amostral de 16 pacientes por grupo, com poder estatístico de 0.8. Devido à possibilidade de variações no desvio-padrão dos diversos ensaios que foram usados, optamos por uma amostra um pouco maior (20 indivíduos por grupo).

4.9 Análise estatística

Os dados quantitativos foram expressos como mediana, percentis, valores mínimos e máximos, além de média e desvio padrão, conforme decisão no momento da análise. Para comparação entre grupos (admissão x convalescença), a distribuição das variáveis (Gaussiana ou não Gaussiana) foi testada pelo método de Kolmogorov (ou Shapiro-Wilk), e teste t ou Mann-Whitney, conforme o padrão de distribuição). As comparações entre amostras pré e pós foram feitas com testes dependentes (teste t dependente ou Wilcoxon, conforme o padrão de distribuição da amostra). Correlações foram avaliadas pelo teste de Pearson ou Spearman (também escolhido conforme a distribuição da amostra). Significância estatística foi considerada quando $P < 0,05$.

Um esquema geral do fluxo do estudo é mostrado na **figura 8**.

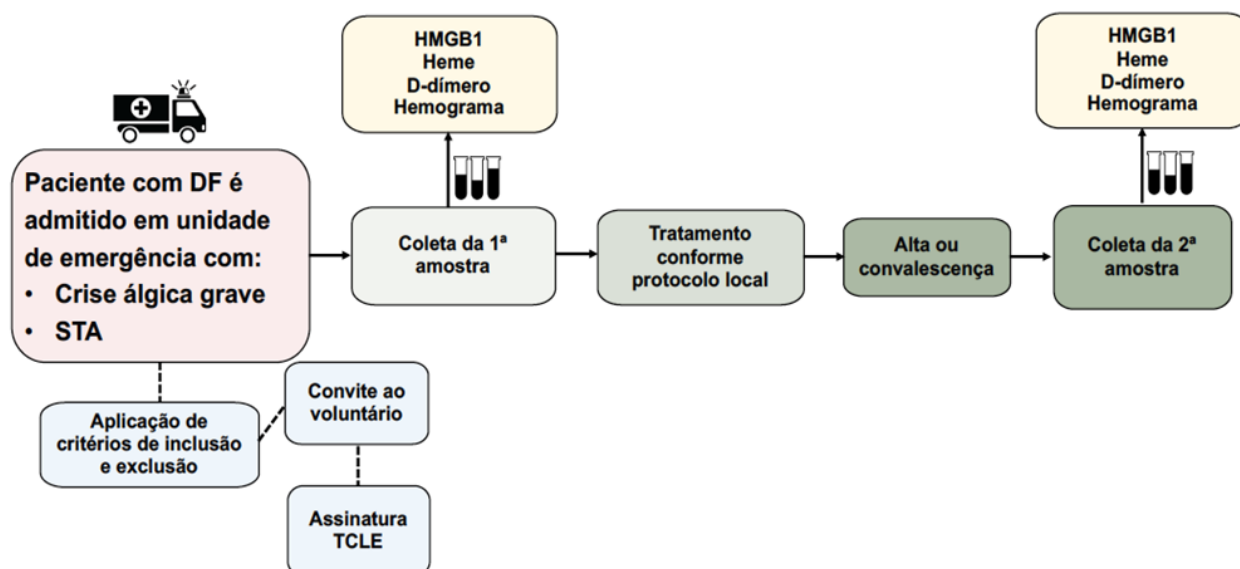


Figura 8. Fluxograma do estudo

5 RESULTADO

5.1 Artigo Original: Changes in heme levels during vaso-occlusive crisis in sickle cell disease

Evilazio Cunha Cardoso¹. Pedro Vieira da Silva Neto¹. Bidossessi Wilfried Hounkpe². Francine Chenou². Cintia Xerez Albuquerque¹, Adriana Malheiro¹, Purim Cesar¹, Erich V De Paula^{1,2*}, Nelson Abraham Fraiji¹.

¹ Hematology and Hemotherapy Foundation from Amazonas State (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil

² Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Running title: Heme levels in vaso-occlusive crisis

Word Count: 2710 (excluding abstract)

*Corresponding author:

Erich Vinicius De Paula, MD, PhD

Hematology and Hemotherapy Center

University of Campinas. Campinas, SP, Brazil

E-mail: erich@unicamp.br

Abstract

Background: Sickle cell disease (SCD) is associated with increased levels of extracellular heme, which has been considered a key mediator of inflammation in this condition. Despite abundant evidence supporting this concept in cell and animal models, very few studies addressed the association of heme levels with SCD severity. **Methods:** This was a cross-sectional study in patients with acute vaso-occlusive crisis (VOC) evaluating the association between total heme levels and clinical characteristics of VOC. Heme levels were measured in serum at admission and after convalescence (discharge or first return visit to outpatient clinic), and correlated with other clinical and laboratory markers of SCD severity. **Results:** Twenty-eight admission were included, in 25 patients. Heme levels were similar between admission and convalescence. We did not observe any association between total heme levels with clinical markers such as VOC duration, development of acute chest syndrome or baseline SCD severity score. Mild to moderate correlations were observed between heme levels at admission with hemolysis markers, but not with markers of coagulation (D-dimer) or inflammation (platelet, neutrophil, monocyte counts). **Conclusion:** In the course of VOC, the pattern of variation in total heme levels in serum is heterogeneous, and does not associate with clinical and laboratory markers of SCD severity or inflammatory activity. These results highlight the importance of refining the methods to measure free heme in biological matrices so that the association of heme with inflammation and coagulation in SCD can be confirmed in human studies.

Keywords: Sickle cell disease, heme, D-dimer, thromboembolism, vaso-occlusion

Introduction

Intravascular hemolysis, a key component of the pathogenesis of sickle cell disease (SCD), results in the release of hemoglobin (Hb) and heme from red blood cells, and leads to the saturation and depletion of haptoglobin and hemopexin, which are the physiological proteins responsible for the sequestration of Hb and heme from the extracellular milieu (KATO, GREGORY J; STEINBERG; GLADWIN, 2017; SCHAER *et al.*, 2014). Although higher levels of heme and decreased levels of hemopexin have been demonstrated in SCD for more than 50 years (MULLER-EBERHARD *et al.*, 1968), it was only in the last two decades that the amount of evidence suggesting that extracellular heme could act as pro-inflammatory mediator in SCD increased (BELCHER *et al.*, 2010, 2014; CHEN, GRACE *et al.*, 2014; GHOSH *et al.*, 2013), supporting the concept that extracellular heme represents a key element in the pathogenesis of SCD (KATO, GREGORY J *et al.*, 2018; MENDONÇA; SILVEIRA; CONRAN, 2016; SOARES; BOZZA, 2016). Of note, it has been hypothesized that extracellular heme could be a key mediator of coagulation activation and of the higher thromboembolic risk observed in hemolytic anemias (DE SOUZA *et al.*, 2017; FRIMAT *et al.*, 2013; HOUNKPE *et al.*, 2015; MERLE *et al.*, 2018; ROUMENINA *et al.*, 2016; SPARKENBAUGH, ERICA M *et al.*, 2015).

Despite the evidence demonstrating that heme activates several compartments of innate immunity, inflammation and hemostasis in cells and animal models of SCD (DE SOUZA *et al.*, 2017; DUTRA; BOZZA, 2014; FIGUEIREDO *et al.*, 2007; FRIMAT *et al.*, 2013; MERLE *et al.*, 2019; SPARKENBAUGH, ERICA M *et al.*, 2015; WAGENER *et al.*, 2001), the precise role of heme in the pathogenesis of SCD in humans has not been fully elucidated, as several caveats make the study of heme challenging (OH *et al.*, 2016; VALLELIAN *et al.*, 2018), and indirect evidence suggest that heme exerts a more complex and heterogenous effect in animal models of other conditions (DESBUARDES *et al.*, 2007; LU; CHEN-ROETLING; REGAN, 2014) and in humans (GREEN *et al.*, 1983; GREEN; TS'AO, 1990; VOLIN *et al.*, 1988).

Acute vaso-occlusive crisis (VOC) is normally triggered by conditions such as infection and dehydration, capable to exacerbate proinflammatory mechanisms such as neutrophil, red blood cells and platelet adhesion to the endothelium (REES, David

C; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Higher levels of extracellular heme have been associated with the trigger of acute VOC both in animal models (BELCHER *et al.*, 2014; GHOSH *et al.*, 2013) and in a study in humans which associated higher free heme plasma levels with increased risk of acute chest syndrome (ADISA *et al.*, 2013). Here we measures heme levels in patients with acute VOC episodes at admission and after convalescence and investigated its association with clinical and laboratory markers of severity and inflammation in SCD.

Materials and methods

Study subjects

This was a cross-sectional study that enrolled patients with a confirmed diagnosis of SCD followed at the outpatient public care center of HEMOAM, in Manaus, Amazon, Brazil. At the time when the study was initiated, 236 patients with SCD were registered at this center. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the institute's research ethical committee (CAAE: 71147817.3.0000.0009). All patients provided a written informed consent prior to any study procedure.

Inclusion criteria included admission in the emergency unit of HEMOAM in the last 48 hours before enrollment due to either (i) severe acute pain crisis, defined as a typical acute pain crisis requiring at least four hours of parenteral analgesia; and/or (ii) acute chest syndrome, defined by the occurrence of new lung infiltrates (on auscultation or chest X-ray) in a patient presenting one or more of the following signs/symptoms: fever, chest pain, tachypnea, cough or hypoxemia (VICHINSKY, EP *et al.*, 2000). Exclusion criteria included: hemodynamic instability, transfusion of two or more red blood cell concentrates in the same admission prior to enrollment; absence of suitable venous access for sample collection; and age < 10 years old. Patients were allowed to be enrolled more than once, provided a complete resolution of the prior VOC of at least 30 days.

Sample collection and processing

Samples were obtained in two different time-points from a peripheral vein by one of the investigators trained in venipunctures with minimal trauma. In patients in whom a peripheral venipuncture was not feasible and who presented a central venous catheter, 3ml of whole blood were discarded prior to sample collection. Samples were collected immediately after enrollment (admission) and after

convalescence. Convalescent samples were obtained immediately before discharge or in the first outpatient visit, and were labeled as immediate or late convalescence respectively.

For the obtention of platelet poor plasma, whole blood collected in 3.2% sodium citrate tubes was centrifuged at 1,200g for 15 minutes at 4°C. For the obtention of serum, non-anticoagulated blood was allowed to clot at 22°C for 30 minutes, and then centrifuged at 800g for 10 min at 4 °C. Serum and plasma aliquots were stored at -80°C until analysis. Samples from hematological analyses were collected in EDTA tubes and immediately sent to the laboratory for analysis.

Clinical and laboratory data

Demographic and clinical data, including the clinical course and outcome of VOC were obtained from the medical records of HEMOAM. For a subgroup of patients (16/25), a validated SCD severity score (SEBASTIANI *et al.*, 2007) was available from a recent publication from our group and was included in our analysis (CESAR *et al.*, 2019). Heme levels were in serum, corresponding to heme bound to albumin and other proteins, were measured using a colorimetric assay (Quantichrom, Bioassays Systems, USA). Serum was used to minimize the interference of cell free hemoglobin in plasma to heme measurements using this method (OH *et al.*, 2016). D-dimer levels were measured in platelet poor plasma with an automated coagulometer (ACL AcuStar, Instrumentation Laboratory, USA) using an immunoturbidimetric assay (HemosIL, AcuStar D-Dimer test, Instrumentation Laboratory, USA). Reticulocyte and complete blood counts were performed in an automated hematology analyzer (Advia 2120, Siemens Healthcare, Germany).

Statistical analysis

Data are presented as average, median, standard deviation (SD) and range, as indicated in each table or figure. The comparison between admission and convalescent samples was performed using paired t-test or Wilcoxon test for variables with Gaussian or non-Gaussian distribution, respectively, as determined by the D`Agostino & Pearson normality test. For unpaired variables, comparisons were made using the t or Mann-Whitney test, respectively. Correlations were assessed by the Pearson or Spearman correlation tests, according to the data distribution. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 7.0. A minimal sample size of 16 patients was defined to detect differences of 1SD between admission and

convalescent samples, with a statistical power of 0.8. A P value < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

From May 2018 and April 2019, 37 admissions due to severe acute pain crisis or acute chest syndrome. Nine admissions were excluded from the study due to: refusal to participate (n=3), two or more transfusions before enrollment (n=2), absence of venous access (n=2), and age < 10 years-old (n=2). In total, 28 episodes of VOC were included, in 25 patients with SCD (three patients were enrolled twice). Demographic and clinical characteristics of the study population are shown in table 1. Our population consisted of patients with frequent VOC (median of 5 admissions in the last year). The median SCD severity score reflects the severity of our population. For a subgroup of patients, a previously validated severity score was available from a recent study from our group. The clinical characteristics of the VOC are shown in table 2. Of the 28 episodes, 24 presented as pain crisis, and 4 as acute chest syndrome. Of the 24 patients presenting with acute pain, 3 evolved to acute chest syndrome in the course of the hospital stay. The median duration of hospital stay (LOS) was 4 days, ranging from 2 to 23.

Blood samples were obtained from all patients at admission, and from 20 patients at convalescence. Of the latter, 8 were obtained at patient discharge from the emergency unit (subgroup: immediate convalescence) and 12 at the first visit to the outpatient clinic after discharge (subgroup: late convalescence). The median time between the collection of admission and convalescence samples were 13.5 days (7-28) and 73.5 days (17-132) for immediate and late convalescence, respectively.

The hematological variables measured during acute VOC are shown in table 3. Most hematological parameters differed when these two time-points were compared.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the study population

Demographic and clinical characteristics	n= 25
Age , median (range)	24 (10 – 50)
Sex , n (male/female)	12 /16
SCD genotype	
HbSS, n (%)	25 (100%)

Use of hydroxyurea, n (%)	25 (100%)
Regular transfusion therapy	None
History of stroke, n (%)	6 (24%)
Femoral head osteonecrosis, n (%)	4 (16%)
Frequency of VOC in the previous 12 months, median (range)	5 (2 – 16)
SCD severity score, median (range) *	0.67 (0.13 – 0.97)

SCD: sickle cell disease, VOC: vaso-occlusive crisis; * data available for 16 patients

Table 2. Clinical presentation of acute vaso-occlusive crisis

Clinical presentation	n= 28
Pain, n (%)	24* (86%)
Acute chest syndrome, n (%)	7* (25%)
Fever, n (%)	6 (21%)
Hospital length of stay (LOS), days, median (range)	4 (2 -23)
Treatment strategies during VOC	
Analgesia with opioids, n (%)	28 (100%)
Antibiotics, n (%)	5 (18%)
Transfusions (any), n (%)	7 (25%)
Exchange transfusion, n (%)	7 (25%)
Oxygen therapy, n (%)	10 (36%)
Mechanical ventilation	None
Vasoactive drugs	None

* 24 episodes presented as pain crisis, of which 3 evolved to acute chest syndrome; 4 episodes were characterized as acute chest syndrome from the time of admission.

Table 3. Hematological parameters during acute VOC

	Admission (n=28)*	Convalescence (n=20)*	P **
Hb (g/dL)	7.5 (5.2-11.0)	8.4 (6.6-10.6)	0.008
Mean corpuscular volume (fL)	91.1 (64.5-122.9)	91.1 (70.6-106.3)	0.736
RDW (%)	21.2 (16.4-26.4)	20.3 (16.1-28.1)	0.585
Platelet count (x10⁹/L)	417.5 (154.0-911.0)	471.0 (276.0-1060.0)	0.048
Mean platelet volume (fL)	9.2 (6.4-10.9)	10.0 (6.6-12.9)	<0.0001
Leukocytes (x10⁹/L)	11.1 (3.0-26.51)	9.2 (2.2-15.9)	0.008
Neutrophils (x10⁹/L)	7.1 (0.8-13.5)	4.9 (0.9-11.6)	0.001
Limphocytes (x10⁹/L)	3.1 (0.9-4.8)	3.0 (0.7-6.8)	0.038
Monocytes(x10⁹/L)	0.7 (0.2-1.7)	0.6 (0.2-1.2)	0.002
Reticulocytes (x10⁹/L)	260.0 (11.9-706.0)	231.0 (22.5-432.0)	0.272
Reticulocytes (%)	9.6 (0.5-25.0)	7.2 (2.1-19.4)	0.617

* All values expressed as medians and range; **: Paired t-test. Hb: hemoglobin; RDW: red blood cell distribution width.

In regard to heme levels during VOC, no difference could be observed in heme levels at admission compared to convalescence (figure 1a). When convalescence samples were divided in immediate and late convalescent samples, a trend towards lower heme levels at convalesce was observed in the former group (figure 1b), but not in the latter (figure 1c). We also measured D-dimer levels, as an indirect marker of thrombin generation/coagulation activation. As shown in figure 2, no difference between admission and convalescent samples could be observed (figure 2).

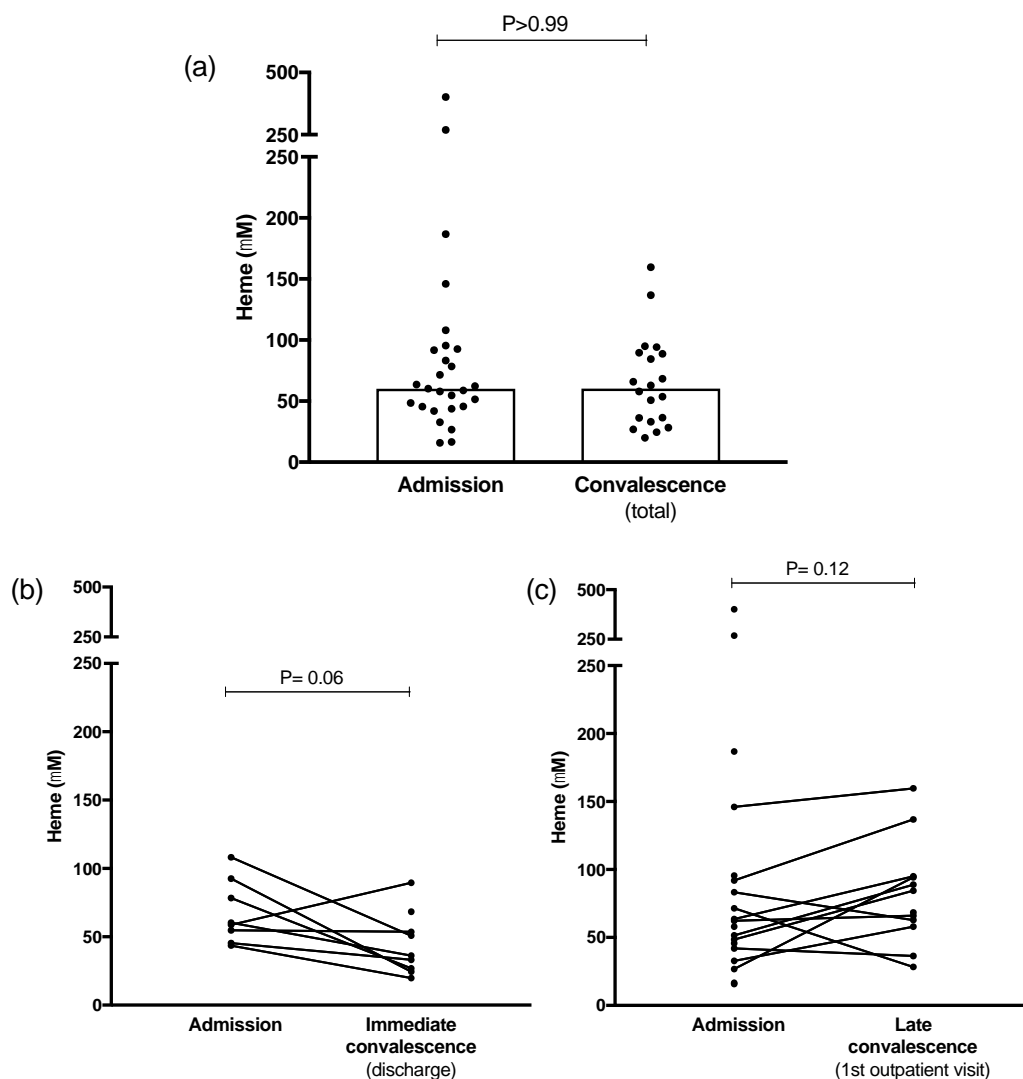


Figure 1: Heme levels measured in serum of sickle cell disease patients at admission ($n=28$) and convalescence ($n=20$). (a). In the lower panels, convalescent samples were subgrouped according to the time between admission and sample collection, whether at patient discharge (termed immediate convalescence, figure 1b, $n=8$) or at the first return visit to the outpatient clinic (termed late convalescence, figure 1c, $n=12$). Pre and post comparisons were performed with the Wilcoxon test.

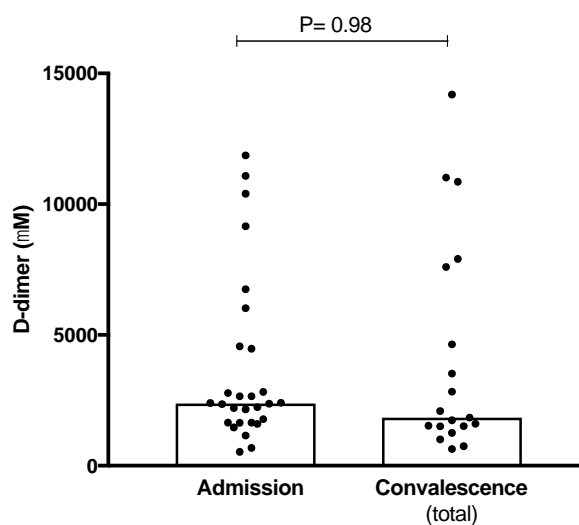


Figure 2: D-dimer levels measured in serum of sickle cell disease patients at admission (n=28) and convalescence (n=20). Pre and post comparisons were performed with the Wilcoxon test.

We then investigated whether heme levels at admission or convalescence were associated with VOC severity, using hospital length of stay (LOS) as a proxy of VOC severity. As shown in figures 3a and 3b, when patients were stratified by the median levels of heme, no difference could be observed in hospital LOS.

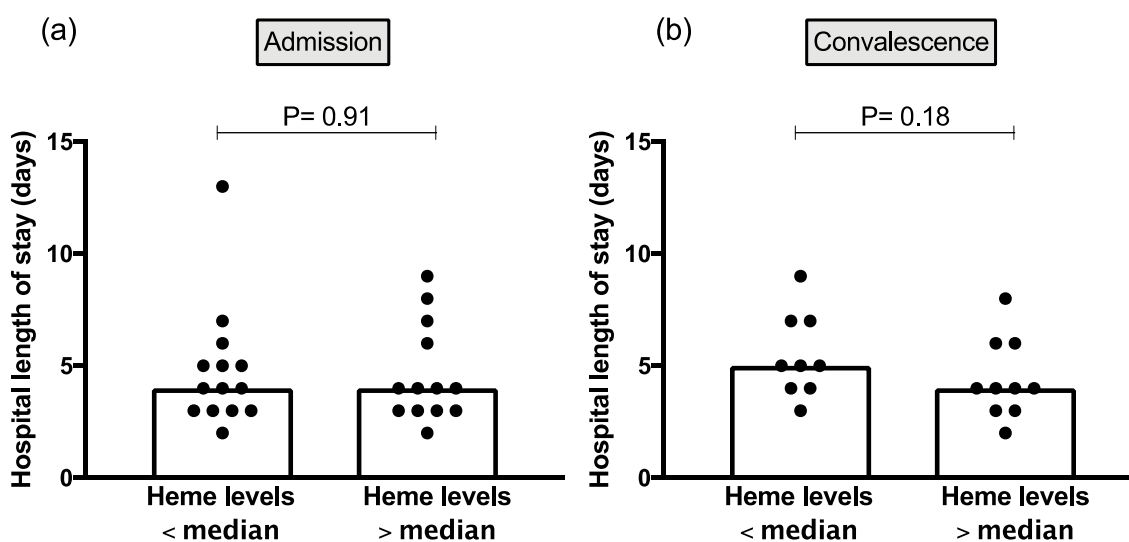


Figure 3: Association between heme levels with hospital length of stay (LOS). LOS comparison between patient subgroups stratified by the median levels of heme at admission (a) and convalescence (b), showing that heme levels at either time-point was not associated with hospital LOS. Comparisons were performed with the Mann-Whitney test.

Next, we explored the correlations between heme levels with clinical and laboratory parameters associated with VOC severity, and with activation of inflammation and hemostasis. Heme levels at admission presented mild to moderate statistically significant correlations with mean platelet volume, reticulocyte counts and delta Hb (Hb at admission – Hb at convalescence) (table 4). Of note, no signal of association could be observed between heme levels and markers of inflammatory and hemostasis activation such as neutrophils, monocytes, platelets or D-dimer. Similarly, heme levels at admission were not associated with hospital LOS or with the SCD severity score.

Table 4. Correlation between heme levels measured at admission with clinical and laboratory parameters.

Variables	R_s Coefficient	CI 95%	P
D-dimer (admission)	-0.09	-0.46 to 0.31	0.65
D-dimer (convalescence)	0.15	-0.35 to 0.59	0.54
Hb (admission)	0.21	-0.20 to 0.55	0.29
Hb (convalescence)	-0.09	-0.53 to 0.39	0.71
MCV (admission)	0.33	-0.071 to 0.64	0.09
MCV (convalescence)	0.16	-0.33 to 0.58	0.52
RDW (admission)	0.053	-0.34 to 0.43	0.79
RDW (convalescence)	-0.37	-0.71 to 0.11	0.11
Platelet count (admission)	-0.15	-0.51 to 0.25	0.44
Platelet count (convalescence)	-0.23	-0.62 to 0.27	0.35
Mean platelet volume (admission)	0.45	0.06 to 0.71	0.02
Mean platelet volume (convalescence)	0.07	-0.41 to 0.52	0.77
Leukocytes (admission)	0.03	-0.36 to 0.41	0.88
Leukocytes (convalescence)	-0.03	-0.50 to 0.45	0.89
Neutrophils (admission)	0.07	-0.33 to 0.45	0.72
Neutrophils (convalescence)	0.20	-0.32 to 0.61	0.44
Monocytes (admission)	0.03	-0.37 to 0.41	0.89
Monocytes (convalescence)	-0.04	-0.51 to 0.44	0.87
Retic. count. absolute (admission)	0.35	-0.05 to 0.66	0.07
Retic. count. absolute (convalescence)	0.52	0.07 to 0.79	0.02
Retic (%) (admission)	0.38	-0.02 to 0.68	0.05
Retic (%) (convalescence)	0.37	-0.12 to 0.71	0.12

Delta Hb**	0.45	-0.02 to 0.76	0.05
Length of stay in days	-0.21	-0.56 to 0.20	0.30
SCD severity score	0.45	-0.07 to 0.78	0.08

* R_s Coefficient: Spearman correlation coefficient; ** Delta Hb refers to the difference between Hb levels at admission and convalescence, in g/dL. Hb: hemoglobin; MCV: mean corpuscular volume; RDW: red blood cell distribution width. Hb: hemoglobin; RDW: red blood cell distribution width; Retic: reticulocytes.

Finally, we compared heme levels at admission between patients with acute chest syndrome or acute pain VOC (figure 4a) or with low (below median) or high (above median) SCD severity score, and no difference could be observed.

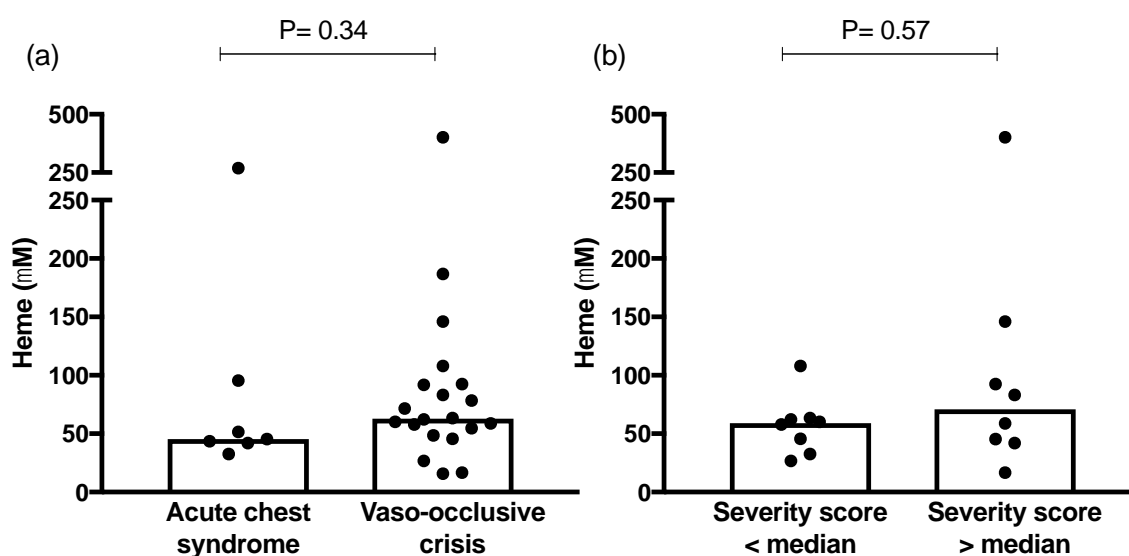


Figure 4. Heme levels at admission in patients who developed acute chest syndrome (n=7) or only acute pain VOC (n=20). Mann-Whitney test.

Discussion

In the last two decades, robust data in cells and animal models were published supporting the concept that extracellular heme is a key mediator of inflammation in SCD, and a potential activator of hemostasis in hemolytic anemias. However, limited data is available associating circulating heme levels with clinical and laboratory markers of severity and/or inflammatory activity in SCD. Using a population of SCD patients with a severe phenotype, we explored the kinetics of heme levels from admission to convalescence of VOC, as well as the associations of heme levels with relevant clinical and laboratory features of SCD. The main result of our study was

that serum heme levels are not associated with clinical and laboratory markers of SCD severity or inflammatory activity during in our population of patients with VOC.

Since the first demonstration that heme could as an activator of innate immunity (WAGENER *et al.*, 2001), and the elucidation of the cellular and molecular pathways by which heme exerts its effects on immune cells (FIGUEIREDO *et al.*, 2007), studies have been published associating the release of extracellular heme during hemolysis with most compartments of the immune system that have been associated with the pathogenesis of SCD (CHEN, GRACE *et al.*, 2014; DUTRA *et al.*, 2014; FRIMAT *et al.*, 2013; MERLE *et al.*, 2019; SETTY *et al.*, 2008). In addition, infusions of free heme have been shown to elicit clinical and pathological conditions that are similar to those observed in SCD patients such as acute lung injury (GHOSH *et al.*, 2013) and vaso-occlusion (BELCHER *et al.*, 2014), which have been reversed by the heme scavenging protein hemopexin (GHOSH *et al.*, 2013; VERCELLOTTI *et al.*, 2016). Together, these results reenforced the concept that heme acts as a key mediator in the initiation and perpetuation of the inflammatory response in SCD (MENDONÇA; SILVEIRA; CONRAN, 2016; SCHAER *et al.*, 2014; SOARES; BOZZA, 2016). This concept gain additional biological relevance if one considers the role of heme as an activator of hemostasis (DE SOUZA *et al.*, 2017; SPARKENBAUGH, Erica M *et al.*, 2015), which could underlie not only the increased risk of thrombosis observed in SCD (FOLSOM *et al.*, 2015; NAIK *et al.*, 2014), but also in other more prevalent conditions in which some degree of hemolysis occur in association with coagulation activation such as sepsis, malaria and other hemolytic anemias (NOUBOUOSSIE; KEY; ATAGA, 2016).

Despite all these evidences, very limited data is available showing that circulating heme levels are associated with clinical and laboratory features of SCD in humans. To our knowledge, while several studies confirm that levels of heme in plasma of SCD patients are higher than in healthy individuals (MULLER-EBERHARD *et al.*, 1968; REITER *et al.*, 2002), only one report associated heme levels with increased risk of VOC in SCD (ADISA *et al.*, 2013). A major reason for the paucity of data associating heme levels with SCD severity and/or inflammatory activity in SCD could be the caveats of measuring heme in biological matrices. While the vast majority of studies that measure heme levels in plasma use the same colorimetric assay used in our study, it is well known that this method measures total heme, bound to plasma proteins such as albumin, hemopexin and even hemoglobin, as

recently shown (OH *et al.*, 2016). Interestingly, the above-mentioned study that associated circulating levels of heme with the risk of VOC used an experimental strategy that allowed them to separate free heme from total heme, based on the centrifugation of plasma with filters capable to retain macromolecules, and thus producing a protein-free fraction in which heme was measured. Interestingly, the association of heme levels with the risk of VOC was demonstrated with free heme, but not with total plasma heme. Unfortunately, this method is also subject to the influence of preclinical variables that limit its precision, as shown in a recent publication (OH *et al.*, 2016), and as experienced in our center (personal communication from Prof. Kleber Y Fertrin).

Since VOC is a condition in which both hemolysis and inflammation are expected to be upregulated, we hypothesized that by studying the kinetics of heme levels from admission to convalescence we could be able to demonstrate the association of heme with inflammation and coagulation activation. In the study that described most caveats of measuring heme in biological matrices, it was shown that the assays measures not heme-bound proteins, but also Hb-bound heme, which due to its relative abundance, could severely jeopardize the possibility of viewing total heme measured by colorimetric assays as a proxy of free heme. In fact, it was shown that colorimetric assays are not capable to discern free heme from hemoglobin-bound heme (OH *et al.*, 2016), limiting the possibility of major conclusions based on isolated heme levels. In order to limit the influence of Hb-bound heme, we decided to use serum rather than plasma in our assays.

Our initial hypothesis was that heme levels would decrease from the moment of SCD admission to convalesce. However, although a trend in this direction could be observed when only convalescence samples collected at the time of discharge (immediate convalescence) were analyzed, this trend disappeared when all convalescent samples were analyzed, suggesting that the pattern of variation of total heme levels is heterogenous during SCD.

Similarly in contrast to our initial hypothesis, heme levels were not associated with a relevant marker of coagulation activation, D-Dimer. Of note, D-dimer was selected because it remains as the only single laboratory marker capable to identify patients with increased risk of thrombosis recurrence in several large population trials (JARA-PALOMARES *et al.*, 2018; TOSETTO *et al.*, 2017), performing better than

biomarkers such as thrombin generation, whose association with clinically relevant hypercoagulability in large populations with different diagnosis is still disputable (TRIPODI, 2016). It should be noted that the part of our hypothesis that we were not able to confirm was that among patients with SCD in VOC, heme and D-dimer levels are associated with clinical and laboratory markers of increased severity and/or inflammation. In regard to differences in heme and D-dimer levels between patients and healthy individuals, although we did not specifically perform this comparison as part of this study, a post-hoc comparison of our results with those from a group of healthy individuals from the same region used in a different study demonstrated that both heme and D-Dimer levels are significantly elevated in SCD compared to healthy individuals, confirming previous results (data not shown). While the association of heme levels with clinical and laboratory features in the course of a VOC has not been previously reported to our knowledge, D-dimer levels have been extensively studied as biomarker of VOC severity, with most studies reporting an association between D-dimer levels and clinical severity (ATAGA *et al.*, 2012). In our study D-dimer levels at admission were positively correlated with reticulocyte counts and negatively correlated with Hb level at admission, suggesting an association of this parameter with hemolysis. However, we were not able to detect any association with clinical severity estimated in our study as hospital LOS. We speculate that these differences might be associated with the fact that 100% of our patients were using hydroxyurea (HU), as opposed to other studies in which HU use was lower, since HU has been associated with down-regulation of coagulation in SCD, which could have masked these effects in our population (COLELLA *et al.*, 2012). The fact that we only used LOS as a proxy of clinical severity could also be an explanation, as discussed below in the limitations section.

We also did not find any association of heme levels with other markers of severity and inflammatory activity during VOC such as platelet, leukocyte, neutrophil or monocyte count, hospital LOS and SCD severity score. The only significant association observed in our study was between heme and hemolysis markers (i.e. reticulocyte counts and delta Hb. Accordingly, while our findings are in accordance with the concept that heme is released during surges of intravascular hemolysis, they indicate that total heme measured in serum is not a good biomarker of severity and inflammatory activity in the course of VOC.

There are at least two explanations that deserve to be discussed about these findings. First, as previously mentioned, the vast majority of studies addressing the role of heme as an inflammatory mediator in both humans and animal models measure total heme (normally in plasma) using the same colorimetric method used by us. Of note, although we chose to use serum in our study, heme concentrations in our patients were very similar to those reported in other studies with patients with SCD that used plasma (CARVALHO *et al.*, 2018; VENDRAME *et al.*, 2018), suggesting that total heme in serum or plasma do not differ substantially, in analogy to albumin (MILES *et al.*, 2004), which is the main ligand of heme in the circulation. Rather, the most important aspect of this method is the fact that it does not measure free extracellular heme, which according to literature is the molecule responsible for direct and indirect toxicity to cells and tissues.. As recently shown, this method is not even capable to separate heme bound to Hb from heme bound to proteins such as albumin and hemopexin (OH *et al.*, 2016). Unfortunately, there is no currently available method to measure free heme levels in serum or plasma, so that results based on total heme levels should be examined with caution. Similarly, it is not surprising the limited number of studies associating heme levels with SCD severity, and the fact that the single study that reported plasma levels of heme in SCD comparing steady-state and VOC could not find any difference (CARVALHO *et al.*, 2018). A second explanation for our findings would be a problem in the concept that the net effect of heme released during hemolysis would be deleterious to patients with SCD. While in our opinion this hypothesis is not supported by the vast amount of data pointing to a key role of free extracellular heme in the pathogenesis of SCD, we believe that this possibility deserved to be discussed from at least two perspectives. To some authors, free heme is such an unstable state that whenever it occurred, it would be immediately bound by hemopexin, albumin or other proteins, so that heme effects shown *in vitro* would not be relevant *in vivo* (VALLELIAN *et al.*, 2018). However, this hypothesis does not reconcile the several effects of heme in animal models (BELCHER *et al.*, 2014; CHEN, Grace *et al.*, 2014; FRIMAT *et al.*, 2013; GHOSH *et al.*, 2013; MERLE *et al.*, 2018; SPARKENBAUGH, ERICA M *et al.*, 2015), which are protein-rich models, as well as in cells stimulated in plasma (DE SOUZA *et al.*, 2017). A more feasible explanation would involve the heterogenous effect of heme on live systems, in that the direct and indirect (immune-mediated) toxicity of heme are counterbalanced by its beneficial effect of up-regulating cytoprotective

pathways involving NRF2 and heme-oxygenase (HMOX1). Accordingly, heme infusions has been shown to decrease inflammation in animal models of atherosclerosis, sepsis and intracerebral hemorrhage, by mechanisms dependent on the expression of HMOX1. From this perspective, the failure to show an association between heme levels and disease severity and inflammation could be at least in part due to the fact that heme also activates anti-inflammatory and cytoprotective pathways during VOC. Until an assay that measures free heme is available, a precise understanding of these issues will probably remain speculative.

Our study has limitations that need to be addressed. First, due to the relative low sample size it is not possible to exclude that it may be underpowered to confirm some of the negative results. It should be noted however that recruiting patients with VOC within the first 48 hours of admission is challenging, so that obtaining 20 pairs of admission and convalescent samples are not trivial, and represent a relevant contribution to the literature. Second, the clinical characterization of VOC severity did not include any estimation of pain, which is an endpoint that could have been more sensible than LOS. Third, the fact that part of our convalescent samples were collected at the moment of patient discharge, and part were collected later, at the first return visit to the outpatient clinic could explain our failure to demonstrate any consistent pattern of heme levels in the course of VOC. Last, our panel of markers of inflammatory and coagulation activation markers could have included additional markers commonly associated with endothelial activation. However, in addition to issues related to the context in which the study was conducted, the definition of this relatively short panel was based on the idea of selecting markers whose biological relevance as prognostic factor of SCD or hypercoagulability had been already demonstrated in larger clinical studies.

In conclusion, the pattern of variation of total heme levels in serum in the from admission to convalescence in VOC is heterogenous, and does not associate with clinical and laboratory markers of SCD severity or inflammatory activity. These results highlight the importance of refining the methods to measure free heme in biological matrices so that the association of heme with inflammation and severity in SCD VOC can be confirmed in human studies.

Acknowledgements

This study was funded by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), grants 2016/14172-6 and 2014/00984-3; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Brazil; and Amazonas Research Foundation (FAPEAM).

Author contributions statement

ECC handled ethics approval, enrolled patients, collected and processed samples, analyzed data and drafted the manuscript; Pedro enrolled patients, collected and processed samples and analyzed data; BWH and FC performed heme and D-dimer assays and analyzed data; AM collaborated with laboratory infrastructure and reagents; EVDP designed the study, analyzed data and drafted the manuscript; NAF designed the study and analyzed data. All authors revised and approved all submitted versions of the manuscript.

Conflict of interest statement

The authors declare no competing interests.

References

- Adisa, O. A., Hu, Y., Ghosh, S., Aryee, D., Osunkwo, I., and Ofori-Acquah, S. F. (2013). Association between plasma free haem and incidence of vaso-occlusive episodes and acute chest syndrome in children with sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* 162, 702–5. doi:10.1111/bjh.12445.
- Ataga, K. I., Brittain, J. E., Desai, P., May, R., Jones, S., Delaney, J., et al. (2012). Association of coagulation activation with clinical complications in sickle cell disease. *PLoS One* 7, e29786. doi:10.1371/journal.pone.0029786.
- Belcher, J., Chen, C., Nguyen, J., Milbauer, L., Abdulla, F., Alayash, A., et al. (2014a). Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood* 123, 377–90.
- Belcher, J. D., Beckman, J. D., Balla, G., Balla, J., and Vercellotti, G. (2010). Heme degradation and vascular injury. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 233–48. doi:10.1089/ars.2009.2822.
- Belcher, J. D., Chen, C., Nguyen, J., Milbauer, L., Abdulla, F., Alayash, A. I., et al. (2014b). Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood* 123, 377–90.

doi:10.1182/blood-2013-04-495887.

- Carvalho, M. O. S., Araujo-Santos, T., Reis, J. H. O., Rocha, L. C., Cerqueira, B. A. V., Luz, N. F., et al. (2018). Inflammatory mediators in sickle cell anaemia highlight the difference between steady state and crisis in paediatric patients. *Br. J. Haematol.* 182, 933–936. doi:10.1111/bjh.14896.
- Cesar, P., Dhyani, A., Augusto Schwade, L., Acordi, P., Xerez Albuquerque, C., Nina, R., et al. (2019). Epidemiological, clinical, and severity characterization of sickle cell disease in a population from the Brazilian Amazon. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* doi:10.1016/j.hemonc.2019.04.002.
- Chen, G., Zhang, D., Fuchs, T. A., Manwani, D., Wagner, D. D., and Frenette, P. S. (2014). Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood* 123, 3818–27. doi:10.1182/blood-2013-10-529982.
- Colella, M. P., De Paula, E. V., Conran, N., Machado-Neto, J. A., Annicchino-Bizzacchi, J. M., Costa, F. F., et al. (2012). Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia. *J. Thromb. Haemost.* 10, 1967–70. doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04861.x.
- de Souza, G. R., Hounkpe, B. W., Fiusa, M. M. L., Colella, M. P., Annicchino-Bizzacchi, J. M., Traina, F., et al. (2017). Tissue factor-dependent coagulation activation by heme: A thromboelastometry study. *PLoS One* 12, e0176505. doi:10.1371/journal.pone.0176505.
- Desbuards, N., Rochefort, G. Y., Schlecht, D., Machet, M.-C. C., Halimi, J.-M. M., Eder, V., et al. (2007). Heme oxygenase-1 inducer hemin prevents vascular thrombosis. *Thromb. Haemost.* 98, 614–620. doi:10.1160/TH06-12-0717.
- Dutra, F. F., Alves, L. S., Rodrigues, D., Fernandez, P. L., de Oliveira, R. B., Golenbock, D. T., et al. (2014). Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E4110-8. doi:10.1073/pnas.1405023111.
- Dutra, F. F., and Bozza, M. T. (2014). Heme on innate immunity and inflammation. *Front. Pharmacol.* 5, 115. doi:10.3389/fphar.2014.00115.
- Figueiredo, R. T., Fernandez, P. L., Mourao-Sa, D. S., Porto, B. N., Dutra, F. F., Alves, L. S., et al. (2007). Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 282, 20221–9. doi:10.1074/jbc.M610737200.
- Folsom, A. R., Tang, W., Roetker, N. S., Kshirsagar, A. V., Derebail, V. K., Lutsey, P.

- L., et al. (2015). Prospective study of sickle cell trait and venous thromboembolism incidence. *J. Thromb. Haemost.* 13, 2–9. doi:10.1111/jth.12787.
- Frimat, M., Tabarin, F., Dimitrov, J. D., Poitou, C., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., et al. (2013). Complement activation by heme as a secondary hit for atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 122, 282–92. doi:10.1182/blood-2013-03-489245.
- Ghosh, S., Adisa, O. A., Chappa, P., Tan, F., Jackson, K. A., Archer, D. R., et al. (2013). Extracellular hemin crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice. *J. Clin. Invest.* 123, 4809–20. doi:10.1172/JCI64578.
- Green, D., Reynolds, N., Klein, J., Kohl, H., and Ts'ao, C. H. (1983). The inactivation of hemostatic factors by hematin. *J. Lab. Clin. Med.* 102, 361–9.
- Green, D., and Ts'ao, C. H. (1990). Hematin: effects on hemostasis. *J. Lab. Clin. Med.* 115, 144–7.
- Hounkpe, B. W., Fiusa, M. M. L., Colella, M. P., da Costa, L. N. G., Benatti, R. de O., Saad, S. T. O., et al. (2015). Role of innate immunity-triggered pathways in the pathogenesis of Sickle Cell Disease: a meta-analysis of gene expression studies. *Sci. Rep.* 5, 17822. doi:10.1038/srep17822.
- Jara-Palomares, L., Solier-Lopez, A., Elias-Hernandez, T., Asensio-Cruz, M. I., Blasco-Esquivias, I., Sanchez-Lopez, V., et al. (2018). D-dimer and high-sensitivity C-reactive protein levels to predict venous thromboembolism recurrence after discontinuation of anticoagulation for cancer-associated thrombosis. *Br. J. Cancer* 119, 915–921. doi:10.1038/s41416-018-0269-5.
- Kato, G. J., Piel, F. B., Reid, C. D., Gaston, M. H., Ohene-Frempong, K., Krishnamurti, L., et al. (2018). Sickle cell disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4, 18010. doi:10.1038/nrdp.2018.10.
- Kato, G. J., Steinberg, M. H., and Gladwin, M. T. (2017). Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J. Clin. Invest.* 127, 750–760. doi:10.1172/JCI89741.
- Lu, X., Chen-Roetling, J., and Regan, R. F. (2014). Systemic hemin therapy attenuates blood-brain barrier disruption after intracerebral hemorrhage. *Neurobiol. Dis.* 70, 245–51. doi:10.1016/j.nbd.2014.06.005.
- Mendonça, R., Silveira, A. A. A., and Conran, N. (2016). Red cell DAMPs and inflammation. *Inflamm. Res.* 65, 665–78. doi:10.1007/s00011-016-0955-9.

- Merle, N. S., Grunenwald, A., Rajaratnam, H., Gnemmi, V., Frimat, M., Figueres, M.-L., et al. (2018). Intravascular hemolysis activates complement via cell-free heme and heme-loaded microvesicles. *JCI Insight* 3. doi:10.1172/jci.insight.96910.
- Merle, N. S., Paule, R., Leon, J., Daugan, M., Robe-Rybkin, T., Poillierat, V., et al. (2019). P-selectin drives complement attack on endothelium during intravascular hemolysis in TLR-4/heme-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 201814797. doi:10.1073/pnas.1814797116.
- Miles, R. R., Roberts, R. F., Putnam, A. R., and Roberts, W. L. (2004). Comparison of serum and heparinized plasma samples for measurement of chemistry analytes. *Clin. Chem.* 50, 1704–6. doi:10.1373/clinchem.2004.036533.
- Muller-Eberhard, U., Javid, J., Liem, H. H., Hanstein, A., and Hanna, M. (1968). Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases. *Blood* 32, 811–5.
- Naik, R. P., Streiff, M. B., Haywood, C., Segal, J. B., and Lanzkron, S. (2014). Venous thromboembolism incidence in the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *J. Thromb. Haemost.* 12, 2010–6. doi:10.1111/jth.12744.
- Noubouossie, D., Key, N. S., and Ataga, K. I. (2016). Coagulation abnormalities of sickle cell disease: Relationship with clinical outcomes and the effect of disease modifying therapies. *Blood Rev.* 30, 245–56. doi:10.1016/j.blre.2015.12.003.
- Oh, J.-Y., Hamm, J., Xu, X., Genschmer, K., Zhong, M., Lebensburger, J., et al. (2016). Absorbance and redox based approaches for measuring free heme and free hemoglobin in biological matrices. *Redox Biol.* 9, 167–177. doi:10.1016/j.redox.2016.08.003.
- Rees, D. C., Williams, T. N., and Gladwin, M. T. (2010). Sickle-cell disease. *Lancet* 376, 2018–31. doi:10.1016/S0140-6736(10)61029-X.
- Reiter, C. D., Wang, X., Tanus-Santos, J. E., Hogg, N., Cannon, R. O., Schechter, A. N., et al. (2002). Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat. Med.* 8, 1383–9. doi:10.1038/nm799.
- Roumenina, L. T., Rayes, J., Lacroix-Desmazes, S., and Dimitrov, J. D. (2016). Heme: Modulator of Plasma Systems in Hemolytic Diseases. *Trends Mol. Med.* 22, 200–13. doi:10.1016/j.molmed.2016.01.004.
- Schaer, D. J., Vinchi, F., Ingoglia, G., Tolosano, E., and Buehler, P. W. (2014). Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways-basic science, clinical

- perspectives, and drug development. *Front. Physiol.* 5, 415. doi:10.3389/fphys.2014.00415.
- Sebastiani, P., Nolan, V. G., Baldwin, C. T., Abad-Grau, M. M., Wang, L., Adewoye, A. H., et al. (2007). A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. *Blood* 110, 2727–35. doi:10.1182/blood-2007-04-084921.
- Setty, B. N. Y., BETAL, S. G., Zhang, J., and Stuart, M. J. (2008). Heme induces endothelial tissue factor expression: potential role in hemostatic activation in patients with hemolytic anemia. *J. Thromb. Haemost.* 6, 2202–9. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03177.x.
- Soares, M. P., and Bozza, M. T. (2016). Red alert: labile heme is an alarmin. *Curr. Opin. Immunol.* 38, 94–100. doi:10.1016/j.coi.2015.11.006.
- Sparkenbaugh, E. M., Chanrathammachart, P., Wang, S., Jonas, W., Kirchhofer, D., Gailani, D. D., et al. (2015). Excess of heme induces tissue factor-dependent activation of coagulation in mice. *Haematologica* 100, 308–14. doi:10.3324/haematol.2014.114728.
- Tosetto, A., Testa, S., Martinelli, I., Poli, D., Cosmi, B., Lodigiani, C., et al. (2017). External validation of the DASH prediction rule: a retrospective cohort study. *J. Thromb. Haemost.* 15, 1963–1970. doi:10.1111/jth.13781.
- Tripodi, A. (2016). Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clin. Chem.* 62, 699–707. doi:10.1373/clinchem.2015.248625.
- Vallelian, F., Schaer, C. A., Deuel, J. W., Ingoglia, G., Humar, R., Buehler, P. W., et al. (2018). Revisiting the putative role of heme as a trigger of inflammation. *Pharmacol. Res. Perspect.* 6, e00392. doi:10.1002/prp2.392.
- Vendrame, F., Olops, L., Saad, S. T. O., Costa, F. F., and Fertrin, K. Y. (2018). Differences in heme and hemopexin content in lipoproteins from patients with sickle cell disease. *J. Clin. Lipidol.* 12, 1532–1538. doi:10.1016/j.jacl.2018.08.002.
- Vercellotti, G. M., Zhang, P., Nguyen, J., Abdulla, F., Chen, C., Nguyen, P., et al. (2016). Hepatic Overexpression of Hemopexin Inhibits Inflammation and Vascular Stasis in Murine Models of Sickle Cell Disease. *Mol. Med.* 22, 1. doi:10.2119/molmed.2016.00063.
- Vichinsky, E. P., Neumayr, L. D., Earles, A. N., Williams, R., Lennette, E. T., Dean, D., et al. (2000). Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. *N. Engl. J. Med.*

342, 1855–65. doi:10.1056/NEJM200006223422502.

Volin, L., Rasi, V., Vahtera, E., and Tenhunen, R. (1988). Heme arginate: effects on hemostasis. *Blood* 71, 625–8.

Wagener, F. A. D. T. G., Eggert, A., Boerman, O. C., Oyen, W. J. G., Verhofstad, A., Abraham, N. G., et al. (2001). Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* 98, 1802–1811. doi:10.1182/blood.V98.6.1802.

5.2 Quantificação de HMGB1

Realizamos a quantificação de HMGB1 pela técnica de ELISA, as amostras de soro foram feitas em duplicatas como recomendadas pelo fabricante, no entanto os resultados ficaram abaixo do limite de detecção.

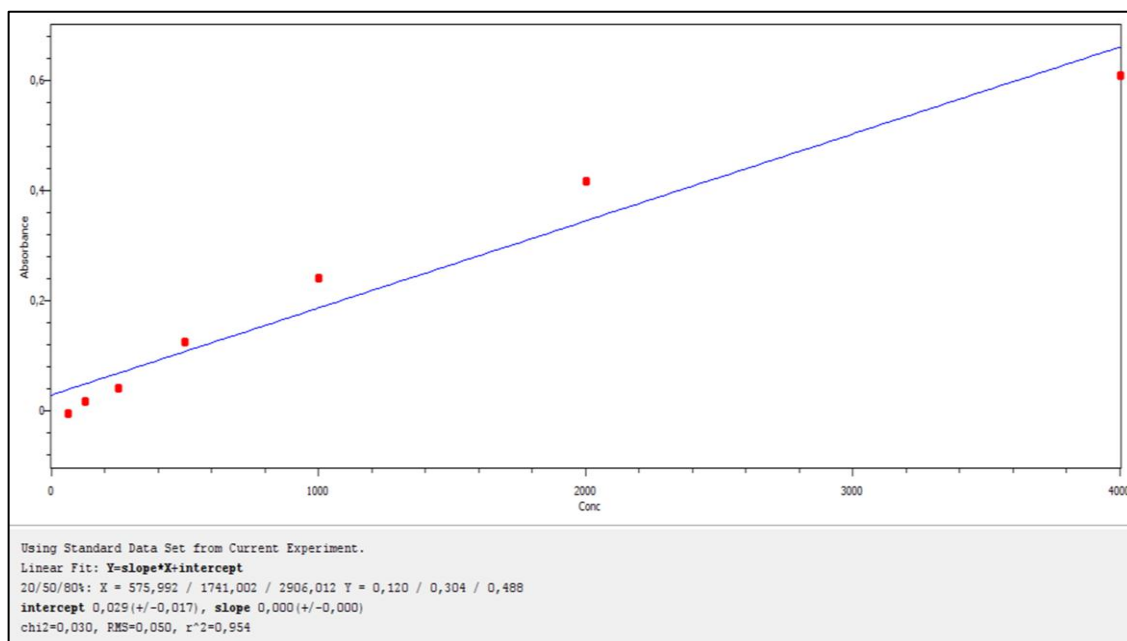


Figura 9. Absorbância da curva padrão de HMGB1 medidos no soro de pacientes com doença falciforme na admissão (n = 28) e convalescença (n = 20).

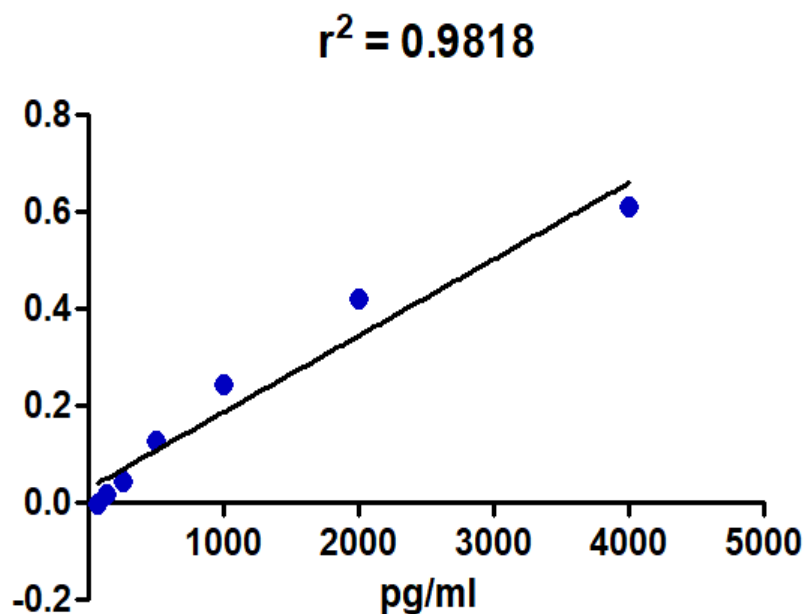


Figura 10. Relação da concentração da curva padrão de HMGB1 medidos no soro de pacientes com doença falciforme na admissão ($n = 28$) e convalescença ($n = 20$).

Embora a curva tenha gerado resultados coerentes com as orientações do fabricante, o sinal observado em nossas amostras foram muito abaixo do que é relatado para a DF. Acreditamos que tal fato pode decorrer de questões técnicas ligadas ao kit comercial usado, que permaneceu durante seu transporte em temperatura acima do recomendado. Iremos repetir as dosagens com a aquisição de um novo kit (novos recursos serão solicitados).

6 DISCUSSÃO

Nas duas últimas décadas, dados robustos em células e modelos animais foram publicados apoiando o conceito de que o heme extracelular é um mediador chave da inflamação na DF, e um potencial ativador da hemostasia em anemias hemolíticas. No entanto, dados limitados estão disponíveis associando os níveis de heme circulantes com marcadores clínicos e laboratoriais de gravidade e / ou atividade inflamatória em SCD. Utilizando uma população de pacientes com DF com um fenótipo grave, exploramos a cinética dos níveis de heme desde a admissão até a convalescença de CVO, bem como as associações dos níveis de heme com características clínicas e laboratoriais relevantes de SCD. O principal resultado do nosso estudo foi que os níveis séricos de heme não estão associados a marcadores clínicos e laboratoriais da gravidade da doença ou atividade inflamatória durante a nossa população de pacientes com CVO.

Desde a primeira demonstração de que o heme poderia ser um ativador da imunidade inata (Wagener et al., 2001), e a elucidação das vias celulares e moleculares pelas quais o heme exerce seus efeitos sobre as células imunes (Figueiredo et al., 2007), estudos foram publicados associando a liberação de heme extracelular durante a hemólise com a maioria dos compartimentos do sistema imune que têm sido associados com a patogênese da DF (Chen et al., 2014; Dutra et al., 2014; Frimat et al., 2013; Merle et al., 2019; Setty et al., 2008). Além disso, infusões de heme livre demonstraram provocar condições clínicas e patológicas semelhantes às observadas em pacientes com anemia falciforme, como lesão pulmonar aguda (Ghosh et al., 2013) e vaso-oclusão (Belcher et al., 2014), que foram revertidos pela hemopexina proteína sequestradora de heme (Ghosh et al., 2013; Vercellotti et al., 2016). Juntos, esses resultados reforçaram o conceito de que o heme atua como um mediador chave na iniciação e perpetuação da resposta inflamatória na DF (Mendonça et al., 2016; Schaer et al., 2014; Soares e Bozza, 2016). Esse conceito ganha relevância biológica adicional se considerarmos o papel do heme como ativador da hemostase (de Souza et al., 2017; Sparkenbaugh et al., 2015), o que poderia estar por trás não apenas do aumento do risco de trombose observado na DF (Folsom et al., 2015; Naik et al., 2014), mas também em outras condições mais prevalentes em que algum grau de hemólise ocorre em associação com a ativação da coagulação, como sepse, malária e outras anemias hemolíticas (Noubouossie et al., 2016).

Apesar de todas essas evidências, dados muito limitados estão disponíveis, mostrando que os níveis circulantes de heme estão associados às características clínicas e laboratoriais da DF em humanos. Até onde sabemos, enquanto vários estudos confirmam que os níveis de heme no plasma de pacientes com anemia falciforme são mais altos do que em indivíduos saudáveis (Muller-Eberhard et al., 1968; Reiter et al., 2002), apenas um relatou níveis aumentados de risco de CVO em SCD (Adisa et al., 2013). Uma das principais razões para a escassez de dados associando os níveis de heme com gravidade SCD e / ou atividade inflamatória em SCD pode ser a ressalva de medir heme em matrizes biológicas. Embora a grande maioria dos estudos que medem os níveis de heme no plasma usem o mesmo ensaio colorimétrico usado em nosso estudo, é bem conhecido que este método mede heme total, ligado a proteínas plasmáticas como albumina, hemopexina e até mesmo hemoglobina, como mostrado recentemente (Oh et al., 2016). Curiosamente, o estudo acima mencionado que associou os níveis circulantes de heme ao risco de CVO usou uma estratégia experimental que lhes permitiu separar o heme livre do heme total, com base na centrifugação do plasma com filtros capazes de reter macromoléculas e, assim, produzir um fração livre de proteína em que o heme foi medido. Curiosamente, a associação dos níveis de heme com o risco de CVO foi demonstrada com heme livre, mas não com heme plasma total. Infelizmente, este método também está sujeito à influência de variáveis pré-clínicas que limitam sua precisão, como mostrado em uma publicação recente (Oh et al., 2016) e como experiente em nosso centro (comunicação pessoal do Prof. Kleber Y Fertrin).

Como a crise vaso-oclusiva é uma condição na qual espera-se que tanto a hemólise quanto a inflamação sejam reguladas positivamente, hipotetizamos que, estudando a cinética dos níveis de heme da admissão à convalescença, poderíamos demonstrar a associação de heme com inflamação e ativação da coagulação. No estudo que descreveu a maioria das ressalvas de heme medido em matrizes biológicas, foi mostrado que os testes medem não proteínas ligadas ao heme, mas também heme ligado à Hb, que devido a sua abundância relativa, poderia comprometer seriamente a possibilidade de visualizar o heme total medido. Por ensaios colorimétricos como uma proxy do heme livre. De fato, foi demonstrado que os ensaios colorimétricos não são capazes de discernir o heme livre do heme ligado à hemoglobina (Oh et al., 2016), limitando a possibilidade de conclusões

importantes com base em níveis isolados de heme. A fim de limitar a influência do heme ligada à Hb, decidimos usar o soro em vez do plasma em nossos ensaios.

Nossa hipótese inicial era de que os níveis de heme diminuiriam a partir do momento da admissão da SCD para convalescença. Entretanto, embora uma tendência nessa direção possa ser observada quando apenas amostras de convalescença coletadas no momento da alta (convalescença imediata) foram analisadas, essa tendência desapareceu quando todas as amostras de convalescença foram analisadas, sugerindo que o padrão de variação dos níveis totais de heme é heterogêneo durante o SCD.

Da mesma forma, em contraste com a nossa hipótese inicial, os níveis de heme não foram associados a um marcador relevante de ativação da coagulação, D-dímero. É digno de nota que o D-dímero foi selecionado porque permanece como o único marcador laboratorial capaz de identificar pacientes com risco aumentado de recorrência de trombose em vários estudos populacionais de grande porte (Jara-Palomares et al., 2018; Toso et al., 2017). desempenho melhor do que biomarcadores, como a geração de trombina, cuja associação com hipercoagulabilidade clinicamente relevante em grandes populações com diagnóstico diferente ainda é discutível (Tripodi, 2016). Deve-se notar que a parte de nossa hipótese que não fomos capazes de confirmar foi que, entre os pacientes com anemia falciforme na CVO, os níveis de heme e D-dímero estão associados a marcadores clínicos e laboratoriais de maior gravidade e / ou inflamação. Em relação às diferenças nos níveis de heme e D-dímero entre pacientes e indivíduos saudáveis, embora não tenhamos especificamente feito essa comparação como parte deste estudo, uma comparação post-hoc de nossos resultados com aqueles de um grupo de indivíduos saudáveis da população estudada. A mesma região utilizada em um estudo diferente demonstrou que os níveis de heme e D-dímero são significativamente elevados em pacientes com anemia falciforme em comparação com indivíduos saudáveis, confirmando os resultados anteriores (dados não mostrados). Embora a associação dos níveis de heme com características clínicas e laboratoriais no decorrer de uma CVO não tenha sido previamente reportada ao nosso conhecimento, os níveis de D-dímero foram extensivamente estudados como biomarcadores da gravidade da CVO, com a maioria dos estudos relatando uma associação entre D-dímero níveis e gravidade clínica (Ataga et al., 2012). Em nosso estudo, os níveis de D dímero na admissão foram correlacionados positivamente

com as contagens de reticulócitos e negativamente correlacionados com o nível de Hb na admissão, sugerindo uma associação desse parâmetro com a hemólise. No entanto, não conseguimos detectar nenhuma associação com a gravidade clínica estimada em nosso estudo como LOS hospitalar. Nós especulamos que essas diferenças possam estar associadas ao fato de que 100% de nossos pacientes estavam em uso de hidroxiuréia (HU), ao contrário de outros estudos nos quais o uso de HU foi menor, já que a HU tem sido associada à regulação negativa da coagulação na DF. O que poderia ter mascarado esses efeitos em nossa população (Colella et al., 2012). O fato de que usamos apenas o LOS como proxy da gravidade clínica também pode ser uma explicação, conforme discutido abaixo na seção de limitações.

Também não encontramos nenhuma associação dos níveis de heme com outros marcadores de gravidade e atividade inflamatória durante a CVO, como contagem de plaquetas, leucócitos, neutrófilos ou monócitos, LOS hospitalar e escore de gravidade da doença. A única associação significativa observada em nosso estudo foi entre os marcadores heme e hemólise (isto é, contagem de reticulócitos e delta Hb. Assim, enquanto nossos achados estão de acordo com o conceito de que o heme é liberado durante surtos de hemólise intravascular, eles indicam que soro não é um bom biomarcador de gravidade e atividade inflamatória no curso de CVO.

Há pelo menos duas explicações que merecem ser discutidas sobre esses achados. Primeiro, como mencionado anteriormente, a grande maioria dos estudos que abordam o papel do heme como um mediador inflamatório em humanos e modelos animais medem o heme total (normalmente no plasma) usando o mesmo método colorimétrico usado por nós. É importante observar que, embora tenhamos escolhido o uso de soro em nosso estudo, as concentrações de heme em nossos pacientes foram muito semelhantes àsquelas relatadas em outros estudos com pacientes com DF que usaram plasma (Carvalho et al., 2018; Vendrame et al., 2018). Sugerindo que o heme total no soro ou plasma não difere substancialmente, em analogia à albumina (Miles et al., 2004), que é o principal ligante do heme na circulação. Em vez. O aspecto mais importante deste método é o fato de que ele não mede o heme livre extracelular, que de acordo com a literatura é a molécula responsável pela toxicidade direta e indireta para células e tecidos. Como mostrado recentemente, este método não é capaz de separar heme ligado a Hb de heme

ligado a proteínas como a albumina e hemopexina (Oh et al., 2016). Infelizmente, não existe um método atualmente disponível para medir os níveis de heme livre no soro ou no plasma, de modo que os resultados baseados nos níveis totais de heme devam ser examinados com cautela. Da mesma forma, não é surpreendente o número limitado de estudos associando os níveis de heme com a gravidade da DF e o fato de que o único estudo que relatou níveis plasmáticos de heme na DF comparando estado estacionário e CVO não encontrou nenhuma diferença (Carvalho et al. 2018). Uma segunda explicação para nossos achados seria um problema no conceito de que o efeito líquido do heme liberado durante a hemólise seria deletério (danoso/ nocivo) para pacientes com anemia falciforme. Embora em nossa opinião esta hipótese não seja apoiada pela vasta quantidade de dados que apontam para um papel chave do heme extracelular livre na patogênese da DF, acreditamos que essa possibilidade merece ser discutida em pelo menos duas perspectivas. Para alguns autores, o heme livre é um estado tão instável que, sempre que ocorresse, seria imediatamente ligado à hemopexina, à albumina ou a outras proteínas, de modo que os efeitos heme mostrados *in vitro* não seriam relevantes *in vivo* (Vallelian et al., 2018). No entanto, essa hipótese não concilia os vários efeitos do heme em modelos animais (Belcher et al., 2014a; Chen et al., 2014; Frimat et al., 2013; Ghosh et al., 2013; Merle et al., 2018). Sparkenbaugh et al., (2015), que são modelos ricos em proteínas, bem como em células estimuladas no plasma (de Souza et al., 2017). Uma explicação mais viável envolveria o efeito heterogêneo do heme em sistemas vivos, na medida em que a toxicidade direta e indireta (imunomediada) do heme é contrabalançada por seu efeito benéfico de regular positivamente as vias citoprotetoras envolvendo NRF2 e heme-oxigenase (HMOX1). Consequentemente, foi demonstrado que as infusões de heme diminuem a inflamação em modelos animais de aterosclerose, sépsis e hemorragia intracerebral, por mecanismos dependentes da expressão de HMOX1. Nessa perspectiva, a falha em mostrar uma associação entre os níveis de heme e a gravidade da doença e a inflamação pode ser, pelo menos em parte, devido ao fato de que o heme também ativa as vias anti-inflamatórias e citoprotetivas durante a CVO. Até que um ensaio que mede o heme livre esteja disponível, um entendimento preciso dessas questões provavelmente permanecerá especulativo.

Nosso estudo tem limitações que precisam ser abordadas. Em primeiro lugar, devido ao tamanho relativamente baixo da amostra, não é possível excluir que

possa ser insuficiente para confirmar alguns dos resultados negativos. Deve-se notar, no entanto, que o recrutamento de pacientes com CVO dentro das primeiras 48 horas de internação é desafiador, de modo que a obtenção de 20 pares de amostras de internação e convalescentes não é trivial e representa uma contribuição relevante para a literatura. Segundo, a caracterização clínica da gravidade da CVO não incluiu nenhuma estimativa da dor, que é um ponto final que poderia ter sido mais sensível do que o LOS. Terceiro, o fato de que parte de nossas amostras de convalescença foi coletada no momento da alta e outra parte ser coletada mais tarde, no primeiro retorno ao ambulatório, poderia explicar nossa falha em demonstrar qualquer padrão consistente de níveis de heme no curso da CVO. Por fim, nosso painel de marcadores de ativação inflamatória e de coagulação poderia ter incluído marcadores adicionais comumente associados à ativação endotelial. No entanto, além das questões relacionadas ao contexto em que o estudo foi realizado, a definição deste painel relativamente curto foi baseada na ideia de selecionar marcadores cuja relevância biológica como fator prognóstico da DF ou hipercoagulabilidade já havia sido demonstrada em estudos clínicos maiores.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o padrão de variação dos níveis totais de heme no soro na admissão à convalescença em CVO é heterogêneo e não se associa com marcadores clínicos e laboratoriais de gravidade ou atividade inflamatória da DF. Estes resultados destacam a importância de refinar os métodos para medir o heme livre em matrizes biológicas, de modo que a associação de heme com inflamação e gravidade de CVO em SCD pode ser confirmada em estudos em humanos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adisa, Olufolake A *et al.* Association between plasma free haem and incidence of vaso-occlusive episodes and acute chest syndrome in children with sickle cell disease. **British journal of haematology**, v. 162, n. 5, p. 702–5, set. 2013.
- Ataga, Kenneth I *et al.* Association of coagulation activation with clinical complications in sickle cell disease. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e29786, jan. 2012.
- Belcher, JD *et al.* Heme degradation and vascular injury. **Antioxidants & redox signaling**, v. 12, n. 2, p. 233–48, 15 fev. 2010.
- Belcher, JD *et al.* Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. **Blood**, v. 123, n. 3, p. 377–90, jan. 2014.
- Braga, J A P *et al.* Guidelines on neonatal screening and painful vaso-occlusive crisis in sickle cell disease: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Project guidelines: Associação Médica Brasileira - 2016. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, n.º 2, pp. 147–157, 2016.
- Brasil. Doença Falciforme: Diretrizes Básicas da Linha de Cuidados. **Ministério da Saúde**, 2015a.
- Brasil. Doença Falciforme: Conhecer para Cuidar. **Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2015b.
- Cançado, R D.; Jesus, J A. A doença falciforme no Brasil. v. 29, n.º 3, p. 204–206, 2007.
- Carvalho, Magda O S *et al.* Inflammatory mediators in sickle cell anaemia highlight the difference between steady state and crisis in paediatric patients. **British journal of haematology**, v. 182, n. 6, p. 933–936, set. 2018.
- Castro, O *et al.* The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood**, v. 84, n. 2, p. 643–9, 1994.
- Cesar, Purim *et al.* Epidemiological, clinical, and severity characterization of sickle cell disease in a population from the Brazilian Amazon. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, maio 2019.
- Chen, Grace *et al.* Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. **Blood**, v. 123, n. 24, p. 3818–27, jun. 2014.
- Chen, Grace Y; Nuñez, Gabriel. Sterile inflammation: sensing and reacting to

- damage. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826–37, 19 dez. 2010.
- Chiabrando, Deborah *et al.* Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, p. 61, 8 abr. 2014.
- Colella, M. P. *et al.* Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 10, n. 9, p. 1967–1970, 2012.
- Costa, Ff *et al.* Anemia Falciforme. In: Zago, Ma; Falcao, Rp; Pasquini, R (Org.). . **Tratado Hematol.** 1a. ed. [S.l: s.n.], 2013. p. 205–24.
- De Souza, G R *et al.* Tissue factor-dependent coagulation activation by heme: A thromboelastometry study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–10, 2017.
- Desbuids, Nicolas *et al.* Heme oxygenase-1 inducer hemin prevents vascular thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 98, n. 3, p. 614–620, set. 2007.
- Dutra, Fabianno F. *et al.* Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 39, p. E4110-8, set. 2014.
- Dutra, Fabianno F.; BOZZA, Marcelo T. **Heme on innate immunity and inflammation. Frontiers in Pharmacology.** [S.l: s.n.], 2014
- Figueiredo, Rt *et al.* Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 28, p. 20221–9, 13 jul. 2007.
- Folsom, A R *et al.* Prospective study of sickle cell trait and venous thromboembolism incidence. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 13, n. 1, p. 2–9, jan. 2015.
- Frimat, Marie *Et al.* Complement activation by heme as a secondary hit for atypical hemolytic uremic syndrome. **Blood**, v. 122, n. 2, p. 282–92, jul. 2013.
- Ghosh, S *et al.* Extracellular hemin crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 11, p. 4809–20, nov. 2013.
- Gladwin, Mark T.; Kato, Gregory J. **Hemolysis-associated hypercoagulability in sickle cell disease: The plot (and blood) thickens! Haematologica.** [S.l: s.n.], 2008
- Green, D *et al.* The inactivation of hemostatic factors by hematin. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 102, n. 3, p. 361–9, set. 1983.
- Green, D; Ts'ao, C H. Hematin: effects on hemostasis. **The Journal of laboratory**

and clinical medicine, v. 115, n. 2, p. 144–7, mar. 1990.

- Hebbel, RP *et al.* A systems biology consideration of the vasculopathy of sickle cell anemia: the need for multi-modality chemo-prophylaxHebbel, R.P., Vercellotti, G. & Nath, K.A. (2009) A systems biology consideration of the vasculopathy of sickle cell anemia: the need for. **Cardiovascular & hematological disorders drug targets**, v. 9, n. 4, p. 271–92, dez. 2009.
- Higuera, D *et al.* Hemostasis alterations in sickle cell syndrome. **Investigación clínica**, v. 55, n. 2, p. 173–84, jun. 2014.
- Hounkpe, Bidossessi Wilfried *et al.* Role of innate immunity-triggered pathways in the pathogenesis of Sickle Cell Disease: a meta-analysis of gene expression studies. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 17822, jan. 2015.
- Jara-Palomares, Luis *et al.* D-dimer and high-sensitivity C-reactive protein levels to predict venous thromboembolism recurrence after discontinuation of anticoagulation for cancer-associated thrombosis. **British journal of cancer**, v. 119, n. 8, p. 915–921, out. 2018.
- Kato, Gregory J *et al.* Sickle cell disease. **Nature reviews. Disease primers**, v. 4, n. 1, p. 18010, jun. 2018.
- Kato, Gregory J; Gladwin, Mark T; Steinberg, Martin H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Reviews**, v. 21, n. 1, p. 37–47, jan. 2007.
- Kato, Gregory J; Steinberg, Martin H; Gladwin, Mark T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 750–760, mar. 2017.
- Keikhaei, Bijan *et al.* Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. **European Cytokine Network**, 2013.
- Key, Nigel S.; Derebail, Vimal K. Sickle-cell trait: novel clinical significance. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2010, p. 418–422, 2010.
- Lim, Ming Y; ATAGA, Kenneth I; KEY, Nigel S. Hemostatic abnormalities in sickle cell disease. **Current opinion in hematology**, v. 20, n. 5, p. 472–7, set. 2013.
- Lu, Xiangping; Chen-Roetling, Jing; Regan, Raymond F. Systemic hemin therapy attenuates blood-brain barrier disruption after intracerebral hemorrhage.

- Neurobiology of disease**, v. 70, p. 245–51, out. 2014.
- Mendonça, Rafaela; Silveira, Angélica A A; Conran, Nicola. Red cell DAMPs and inflammation. **Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 65, n. 9, p. 665–78, 2016.
- Merle, Nicolas S. *et al.* Intravascular hemolysis activates complement via cell-free heme and heme-loaded microvesicles. **JCI Insight**, v. 3, n. 12, jun. 2018.
- Merle, Nicolas S *et al.* P-selectin drives complement attack on endothelium during intravascular hemolysis in TLR-4/heme-dependent manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, p. 201814797, mar. 2019.
- Miles, Rodney R *et al.* Comparison of serum and heparinized plasma samples for measurement of chemistry analytes. **Clinical chemistry**, v. 50, n. 9, p. 1704–6, set. 2004.
- Miller, Scott T. How I treat acute chest syndrome in children with sickle cell disease. **Blood**, v. 117, n. 20, p. 5297–5305, 2011.
- Muller-Eberhard, U *et al.* Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases. **Blood**, v. 32, n. 5, p. 811–5, nov. 1968.
- Naik, R. P. *et al.* Venous thromboembolism incidence in the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 12, n. 12, p. 2010–2016, 2014.
- Nath, Karl A; Hebbel, Robert P. Sickle cell disease: renal manifestations and mechanisms. **Nature reviews. Nephrology**, v. 11, n. 3, p. 161–71, 10 mar. 2015.
- Newton, Kim; Dixit, Vishva M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, 2012.
- Noubouossie, Denis; Key, Nigel S; Ataga, Kenneth I. Coagulation abnormalities of sickle cell disease: Relationship with clinical outcomes and the effect of disease modifying therapies. **Blood reviews**, v. 30, n. 4, p. 245–56, jul. 2016.
- Odièvre, Marie Hélène *et al.* **Pathophysiological insights in sickle cell disease. Indian Journal of Medical Research.** [S.l: s.n.]. , 2011
- Oh, Joo-Yeun *et al.* Absorbance and redox based approaches for measuring free heme and free hemoglobin in biological matrices. **Redox Biology**, v. 9, p. 167–177, out. 2016.

- Piel, Frédéric B. *et al.* Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1561–1573, 2017.
- Piel, Frédéric B *et al.* Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010-2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. **PLoS medicine**, v. 10, n. 7, p. e1001484, 16 jul. 2013.
- Rees, David C; Williams, Thomas N; Gladwin, Mark T. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018–31, dez. 2010.
- Rees, Dc *et al.* Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018–2031, 11 dez. 2010.
- Reiter, Christopher D *et al.* Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nature medicine**, v. 8, n. 12, p. 1383–9, dez. 2002.
- Roumenina, Lubka T *et al.* Heme: Modulator of Plasma Systems in Hemolytic Diseases. **Trends in molecular medicine**, v. 22, n. 3, p. 200–13, mar. 2016.
- Santana, Janaina *et al.* Beta-Globin Haplotypes and Alpha-Thalassemia 3.7 kb Deletion in Sickle Cell Disease Patients From the Occidental Brazilian Amazon. **Deletion in Sickle Cell Disease Patients From the Occidental Brazilian Amazon**. v. 5, n. 4, p. 123–128, 2016.
- Schaer, Dominik J *et al.* Haptoglobin, Hemopexin, and Related Defense Pathways-Basic Science, Clinical Perspectives, and Drug Development. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 415, jan. 2014.
- Sebastiani, Paola *et al.* A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. **Blood**, v. 110, n. 7, p. 2727–35, out. 2007.
- Setty, B N Y *et al.* Heme induces endothelial tissue factor expression: potential role in hemostatic activation in patients with hemolytic anemia. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 6, n. 12, p. 2202–9, dez. 2008.
- Silva, W S *et al.* Screening for structural hemoglobin variants in bahia, Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 2, p. 13–18, 2016.
- Sins, J. W.R. *et al.* Dynamics of von Willebrand factor reactivity in sickle cell disease during vaso-occlusive crisis and steady state. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2017.
- Soares, Miguel P; Bozza, Marcelo T. Red alert: labile heme is an alarmin. **Current Opinion in Immunology**, v. 38, p. 94–100, fev. 2016.
- Sparkenbaugh, E; Pawlinski, R. **Interplay between coagulation and vascular**

- inflammation in sickle cell disease. British Journal of Haematology.** [S.l.: s.n.], 2013
- Sparkenbaugh, Erica M *et al.* Excess of heme induces tissue factor-dependent activation of coagulation in mice. **Haematologica**, v. 100, n. 3, p. 308–14, jan. 2015.
- Tosetto, A *et al.* External validation of the DASH prediction rule: a retrospective cohort study. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 15, n. 10, p. 1963–1970, out. 2017.
- Tripodi, A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. **Clinical Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 699–707, maio 2016.
- Tsung, A.; Tohme, S.; Billiar, T. R. High-mobility group box-1 in sterile inflammation. **Journal of Internal Medicine**, v. 276, n. 5, p. 425–443, 2014.
- Vallelian, Florence *et al.* Revisiting the putative role of heme as a trigger of inflammation. **Pharmacology research & perspectives**, v. 6, n. 2, p. e00392, abr. 2018.
- Vendrame, Felipe *et al.* Differences in heme and hemopexin content in lipoproteins from patients with sickle cell disease. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 12, n. 6, p. 1532–1538, nov. 2018.
- Vercellotti, Gregory M *et al.* Hepatic Overexpression of Hemopexin Inhibits Inflammation and Vascular Stasis in Murine Models of Sickle Cell Disease. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 22, n. 1, p. 1, jul. 2016.
- Vichinsky, E P *et al.* Acute chest syndrome in sickle cell disease: clinical presentation and course. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood**, v. 89, n. 5, p. 1787–92, 1997.
- Vichinsky, Ep *et al.* Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. **The New England journal of medicine**, v. 342, n. 25, p. 1855–65, 22 jun. 2000.
- Volin, L *et al.* Heme arginate: effects on hemostasis. **Blood**, v. 71, n. 3, p. 625–8, mar. 1988.
- Wagener, Frank A D T G *et al.* Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. **Blood**, v. 98, n. 6, p. 1802–1811, set. 2001.
- Ware, Russell E. *et al.* Sickle cell disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10091, p. 311–323, 2017.

Xu, H *et al.* Sickle cell disease increases high mobility group box 1: a novel mechanism of inflammation. **Blood**, v. 124, n. 26, p. 3978–3982, 2014.

9 ANEXOS

Anexo 1. Termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE

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

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

NÚMERO DO CAAE: 71147817.3.0000.0009

Você está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) dessa pesquisa sobre a doença falciforme. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tem por objetivo garantir seu direito como participante 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 os pesquisadores. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou se quiser retirar sua autorização a qualquer momento, não haverá qualquer tipo de penalização ou prejuízo.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA:

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

resultados são importantes para comparação com os pacientes (o chamado grupo controle).

PROCEDIMENTOS:

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

DESCONFORTOS E RISCOS:

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

BENEFÍCIOS:

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

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:

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

SIGILO E PRIVACIDADE:

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

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO:

Não haverá ressarcimento de despesas de transporte, alimentação, diárias, já que o estudo será feito durante um atendimento médico. Caso você tenha que

comparecer a sua instituição apenas devido a este estudo, você será ressarcido com os custos de transporte (ônibus) e alimentação. Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

ACONSELHAMENTO GENÉTICO:

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

ARMAZENAMENTO DE MATERIAL:

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

() Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo este ser descartado ao fim desta pesquisa.

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

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

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

CONTATO:

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

- **Dr. Nelson Fraiji** - Hemoam – Contato: (92) 3655-0224.
- **Dr. Erich Vinicius de Paula** – Hemocentro da UNICAMP – Contato: (19) 35218627
- **Evilázio Cunha Cardoso** – Hemoam – (92) 99183-6887

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

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

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP).

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

OUTRAS INFORMAÇÕES:

1. O voluntário estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.

2. O voluntário poderá tirar todas as dúvidas que tiver – ou que aparecerem durante o estudo – sobre esta pesquisa, havendo o compromisso do pesquisador em responder a elas.

3. Todas as informações obtidas pelo estudo terão um caráter sigiloso e confidencial e serão usadas apenas com a finalidade de divulgação e publicação científica.

4. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará qualquer prejuízo em outro tratamento ou procedimento de que possa necessitar em qualquer serviço de nosso hospital.

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

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

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

Nome do (a) participante:

Contato telefônico: _____

e-mail (opcional): _____

Data: ____/____/____.

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

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

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

Data: ____/____/____

(Assinatura do pesquisador)

Anexo 2. Termo de assentimento

Título do projeto: **Marcadores de Ativação da Inflamação na Doença Falciforme**

Coordenação da Pesquisa: Orientador Prof. Dr. Nelson Abriam Fraiji e
Coorientador Prof. Dr. Erich Vinícius de Paula e Pesquisador: Evilázio Cunha
Cardoso

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

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

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

Nome do pesquisador responsável: Evilázio Cunha Cardoso

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

Telefone: (92) 99183-6887/ 3655-0218

Todas as informações que serão obtidas são confidenciais, e serão armazenadas em um computador, ou seja, o seu nome não aparecerá em qualquer publicação, apresentação ou documento. Desse modo, você tem a garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos.

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

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

Para o participante:

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

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

Você concorda em participar da pesquisa? Sim Não

Confirmo ter recebido via assinada deste Termo de Assentimento

Manaus/AM, ____ de _____ de _____

Nome do (a) **participante:**

Assinatura do (a) **responsável:**

Anexo 3. Carta de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOAM

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Evilázio Cunha Cardoso

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 71147817.3.0000.0009

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.478.489

Apresentação do Projeto:

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

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

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

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

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