

<sup>c</sup> Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil

<sup>d</sup> Centro de Referência em Doença Falciforme de Itabuna (CERDOFI), Itabuna, BA, Brasil

A doença falciforme (DF) compreende um grupo de hemoglobinopatias que possuem, em comum, produção de hemoglobina S e fisiopatologia caracterizada por hemólise, ruptura de hemácias, intra e extravascular. O fígado concentra boa parte da hemólise extravascular com consequente comprometimento da função hepática em longo prazo, evidenciado por biomarcadores específicos. Nesse contexto, a úlcera de perna na DF, lesão cutânea na região maleolar, tem sido associada à hemólise como fator etiológico. Entretanto, o papel da hemólise extravascular na fisiopatologia da úlcera de perna ainda não está completamente compreendido. Diante do exposto, esse estudo objetivou avaliar biomarcadores hepáticos como componentes da hemólise extravascular para caracterização fisiopatológica da úlcera de perna em pacientes com DF. Estudo de corte transversal descritivo realizado no Centro de Referência a Doença Falciforme de Itabuna, Bahia, no período de julho a novembro de 2019. Os pacientes incluídos nessa casuística foram diagnosticados com DF (AF ou HbSC), em estado estável e fora de terapia transfusional. Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram coletados 15 mL de sangue periférico para posterior análise pelos analisadores automatizados SYSMEX KX21 e COBAS para os seguintes biomarcadores: aspartato aminotransferase (AST/TGO), alanina aminotransferase (ALT/TGP), bilirrubina total e frações, gama glutamil transferase (GGT) e lactato desidrogenase (LDH). As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS versão 20.0 e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Nesse estudo foram incluídos 64 pacientes com DF, sendo 16 pacientes com úlcera de perna (UP+) e 48 sem presença ou história prévia da úlcera (UP-). As análises demonstram níveis elevados de biomarcadores hepáticos em pacientes UP+: AST/TGO (U/L):  $55,81 \pm 39,88$  ( $p = 0,025$ ); GGT (U/L):  $88,19 \pm 67,71$  ( $p = 0,030$ ); LDH (U/L):  $763,19 \pm 347,95$  ( $p = 0,021$ ); bilirrubina total (mg/dL)  $2,88 \pm 2,20$  ( $p = 0,024$ ); bilirrubina indireta (mg/dL)  $2,56 \pm 2,16$  ( $p = 0,022$ ). Além disso, marcadores hepáticos, como AST/TGO, ALT/TGP, GGT, LDH e bilirrubina direta e indireta, em conjunto, foram associados à recorrência da úlcera de perna (2 a 7 vezes) ( $R^2 = 85,4$ ;  $p = 0,002$ ). Em virtude do exposto, o presente estudo sugere que a hemólise extravascular pode exercer papel na etiopatogenia da úlcera de perna na DF, bem como na recorrência das lesões em conjunto com outros fatores, como inflamação, vasculopatia e hipóxia tecidual. Dessa forma, o estudo de marcadores hepáticos associados à hemólise extravascular pode constituir importante ferramenta na elucidação de mecanismos fisiopatológicos da úlcera de perna que ainda não estão completamente compreendidos.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.075>

75

## INFLUÊNCIA DE BIOMARCADORES HEMOLÍTICOS NA OCORRÊNCIA DE ÚLCERA DE PERNA EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA FALCIFORME



E.D.C. Santos<sup>a</sup>, S.P. Carvalho<sup>b</sup>, R.P. Santiago<sup>b</sup>, C.C. Guarda<sup>b</sup>, L.C.G.C. Luiz<sup>a</sup>, C.M. Kaneto<sup>a</sup>, E.V. Adorno<sup>c</sup>, T.C.C. Fonseca<sup>a,d</sup>, M.S. Gonçalves<sup>b</sup>, M.M. Aleluia<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA, Brasil

<sup>b</sup> Laboratório de Investigação em Genética e Hematologia Translacional (LIGHT), Instituto Gonçalo Moniz (IGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, BA, Brasil

<sup>c</sup> Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil

<sup>d</sup> Centro de Referência em Doença Falciforme de Itabuna (CERDOFI), Itabuna, BA, Brasil

A doença falciforme (DF) é caracterizada pela presença da hemoglobina S, em homozigose (HbSS) se constitui a anemia falciforme (AF) e, associada a outras hemoglobinas variantes, como a hemoglobina C, é definida por hemoglobinopatia SC (HbSC). A fisiopatologia da DF decorre de hemólise intravascular, destruição de hemácias, resultando em vasculopatia e complicações clínicas. Nesse contexto, as úlceras de perna constituem lesões cutâneas na região maleolar em 20% de indivíduos brasileiros com DF. Entretanto, os fatores associados à etiopatogenia dessas lesões não estão completamente compreendidos. Diante do exposto, esse estudo objetivou avaliar biomarcadores de hemólise como fatores de associação à ocorrência de úlceras de perna em pacientes com DF. Esse estudo de corte transversal descritivo foi realizado no Centro de Referência a Doença Falciforme de Itabuna, Bahia, no período de julho a novembro de 2019. Todos os pacientes incluídos nessa casuística foram diagnosticados com DF (AF ou HbSC) e estavam em estado estável, fora de terapia transfusional. Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram coletados 15 mL de sangue periférico e analisado pelos analisadores automatizados SYSMEX KX21 e COBAS para os seguintes biomarcadores: hemácias, hemoglobina (Hb), hematócrito, reticulócitos absoluto, bilirrubina total e frações, lactato desidrogenase (LDH) e aspartato aminotransferase (AST/TGO). As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS versão 20.0 e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Nesse estudo foram incluídos 63 pacientes com DF, sendo 16 pacientes com úlcera de perna (UP+) e 47 sem presença ou história prévia da úlcera (UP-). De acordo com as análises realizadas, observou-se um perfil hemolítico exuberante nos pacientes UP+: hemácias ( $106/\mu\text{L}$ )  $2,62 \pm 0,95$  ( $p \leq 0,001$ ); hemoglobina (g/dL)  $9,01 \pm 2,47$  ( $p = 0,037$ ); hematócrito (%)  $27,2 \pm 7,34$  ( $p = 0,008$ ); reticulócitos absoluto  $82.229 \pm 53605$  ( $p = 0,004$ ); LDH (U/L)  $763,19 \pm 347,95$  ( $p = 0,021$ ); bilirrubina total (mg/dL)  $2,88 \pm 2,20$  ( $p = 0,024$ ); bilirrubina indireta (mg/dL)  $2,56 \pm 2,16$  ( $p = 0,022$ ); AST/TGO (U/L)  $55,81 \pm 39,88$  ( $p = 0,025$ ). O processo hemolítico intravascular é um fator preponderante da fisiopatologia da DF, o qual

resulta em disfunção endotelial, inflamação e vasculopatia. Nesse contexto, a úlcera de perna tem sido associada à hemólise frequente em microvasos que irrigam a região maleolar seguido de danos vasculares e hipóxia tecidual, constituindo um potencial fator etiológico para abertura da úlcera. Os níveis acentuados dos biomarcadores descritos nesse estudo, como LDH, bilirrubina total/indireta, reticulócitos e AST/TGO caracterizam um processo hemolítico evidente em pacientes UP+, enquanto os níveis reduzidos de hemácias, Hb e hematócrito evidenciam a anemia crônica causada pela hemólise frequente, agravando o quadro clínico desses pacientes. Ademais, as úlceras de perna incidiram mais significativamente em pacientes com AF, genótipo caracterizado por taxas hemolíticas mais frequentes: 12 pacientes AF UP+ ( $p=0,004$ ). Em virtude do exposto, o presente estudo reforça o caráter hemolítico associado à etiopatogenia das úlceras de perna em pacientes com DF.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.076>

76

#### LEVERAGING PLASMA-DERIVED EXOSOMES FOR BIOMARKER DISCOVERY IN SICKLE CELL DISEASE: PREPARATION FOR A LARGE PROSPECTIVE STUDY

Y. Lamarre<sup>a,b</sup>, A. Aich<sup>c</sup>, M. Islam<sup>d</sup>, J.M. Scianni<sup>e</sup>, A.C.S. Pinto<sup>b</sup>, A.M.C. Tavassi<sup>e</sup>, J. Elion<sup>f,g</sup>, W.E. Nemer<sup>f,g</sup>, R. Saha<sup>d</sup>, S. Kashima<sup>b</sup>, D.T. Covas<sup>b,e</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>b</sup> Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>c</sup> Intel Corporation

<sup>d</sup> Department of Chemical and Biomolecular Engineering, University of Nebraska, Lincoln, United States

<sup>e</sup> Centro de Excelência para Descobertas de Alvos Moleculares, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

<sup>f</sup> UMR\_S1134, Inserm, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<sup>g</sup> Institut National de la Transfusion Sanguine, Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, France

Diverse clinical variability among sickle cell disease (SCD) patients opposes crises prediction, health monitoring and streamlined management. Thus, an unmet need for objective biomarkers prevails. Exosomes are extra-cellular nano-vesicles (50-150 nm), enriched in bioactive lipids, proteins, mRNAs and miRNAs, released by cells. They transport molecular cargo to nearby/distant cells to affect-regulate biological processes. Recent studies by Khalyfa et al. assessed the plasma exosome content, their sources and transcriptomics signature as predictive marker in SCD children with acute chest syndrome. However, the small sample sizes (32 and 33

individuals, respectively) may not capture the clinical variability. Thus, we aim to screen large population (150 patients) with good follow-up available at Regional Blood Center, Ribeirão Preto using omics - proteomics and transcriptomics - of plasma-derived exosomes to identify biomarkers in SCD. However, the grand challenges to this expansive undertaking are: 1) establishing a R3 (reliable, robust and reproducible) exosome extraction protocol, 2) performing high-throughput mass-spectrometry and next generation sequencing, and 3) establishing a reliable multi-level comparative bioinformatics platform to analyze the omics data. Here we present our approach with an international collaborative team to resolve these challenges and preliminary results. Exosomes from plasma from steady state SCD patients and healthy donors were extracted using ultracentrifugation. Exosome characterization involved size-concentration estimate by Nano Tracking Analysis (NTA); western-blot for exosome surface marker CD81, CD63, and CD9, and HSP70 and ALIX as internal controls; shape confirmation by transmission electron microscopy. Interestingly, the size and concentrations were different ( $n=4$  each): size:  $96.05\pm 29.71$  nm (healthy) and  $65.23\pm 21.7$  nm (sickle), and concentrations:  $51.3\pm 10.3e9$  (healthy) and  $107\pm 77.5e9$  (sickle) particles/ml. Reverse-phase LC-MS/MS was done using an Orbitrap Fusion mass-spectrometer at Butantan Institute. From the bioinformatics pipeline established at the University of Nebraska-Lincoln, we were able to extract expression of 2000 proteins per sample from 8 SCD, 2 healthy and 1 mast cell culture samples (mast cells, taken as control, excrete exosomes in physiologic state). We identified 25 significantly down-regulated proteins in SCD samples (vs. healthy) using t-test with equal variance ( $p < 0.05$ )—which include blood proteins, complement proteins and immunoglobins. We identified expression of selected sno-RNAs and miRNAs: RNU 44, miR15a, miR361, miR132, miR16, miR125 and miR181 by qRT-PCR in SCD exosomes. While we are still in process of getting RNA-seq analysis, and the proteomics data are preliminary, these validations are pre-requisites for establishing exosome-based omics-pipeline for biomarker discovery for health monitoring of SCD patients, crises prediction and assessing response-to-therapy.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.077>

77

#### MANIFESTAÇÕES NEUROLÓGICAS EM ADULTOS COM DOENÇA FALCIFORME SEM ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO ANTERIOR: EXPERIÊNCIA DE SERVIÇO DE REFERÊNCIA

S.C. Morais, C.C.J. Oliveira, C.T.O.F. Miranda, A.C.C. Pedro, M.S. Figueiredo

Disciplina de Hematologia e Hemoterapia, Escola Paulista de Medicina (EPM), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brasil

**Objetivo:** Identificar pacientes adultos com Doença Falciforme (DF) sem antecedente de acidente vascular encefálico isquêmico (AVEi) que apresentaram manifestações neurológicas graves. **Material e métodos:** Realizada revisão de

