

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^{a,b}, A. Aich^c, M. Islam^d, J.M. Scianni^e, A.C.S. Pinto^b, A.M.C. Tavassi^e, J. Elion^{f,g}, W.E. Nemer^{f,g}, R. Saha^d, S. Kashima^b, D.T. Covas^{b,e}

^a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Intel Corporation

^d Department of Chemical and Biomolecular Engineering, University of Nebraska, Lincoln, United States

^e Centro de Excelência para Descobertas de Alvos Moleculares, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

^f UMR_S1134, Inserm, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^g 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 ± 29.71 nm (healthy) and 65.23 ± 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



prontuário de 324 pacientes com DF que estiveram em acompanhamento no serviço de anemias hereditárias da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP nos últimos 30 anos. Fatores de inclusão: manifestações neurológicas graves, tais como, acidente vascular encefálico hemorrágico (AVEh), aneurisma cerebral ou síndrome de leucoencefalopatia posterior reversível (PRESS). Fatores de exclusão: AVEi atual ou prévio diagnosticado a partir de quadro clínico e radiológico compatível. **Resultados:** Revisados 324 prontuários com acompanhamento no período analisado. Foram identificados 8 pacientes, 7 com SS e 1 com S β ⁺. A média de idade da manifestação foi 29,2 (\pm 6,3) anos e cinco eram do sexo feminino (62,5%). Quanto à manifestação neurológica: 6 (75%) pacientes com AVEh, um (12,5%) com aneurisma cerebral e um (12,5%) com PRESS. Média de hemoglobina 7,6 (\pm 1,0) g/dL e de leucócitos 11,5 (\pm 2,4) $\times 10^9$ /L. 50% estavam em uso de hidroxiureia (HU) e um (12,5%) em esquema de transfusão crônica devido a doença renal crônica (DRC) em hemodiálise. Com exceção deste último, nenhum outro apresentava comorbidade significativa. Quanto à evolução clínica, cinco dos seis pacientes com AVEh evoluíram para óbito (83%). Dos indivíduos sobreviventes, dois continuam em acompanhamento regular em uso de HU: a) paciente com PRESS com 2 anos de seguimento pós episódio; b) um paciente com AVEh (devido a aneurisma e Moya-Moya) com um ano de seguimento. O paciente com aneurisma sem sangramento permaneceu em acompanhamento irregular por 7 anos após clipagem do aneurisma e perdeu o seguimento há 10 anos. **Discussão:** DF é uma anemia hereditária com diversas manifestações sistêmicas e complicações, sendo o AVE uma das mais graves e de maior morbidade. O AVEi é a manifestação mais comum com maior incidência na infância. Por outro lado, o AVEh é mais frequente em adultos, com mortalidade variando de 30 a 50%. A apresentação mais comum do AVEh é de cefaleia importante com aparecimento agudo de déficit neurológico. Em nossa casuística, apenas um paciente com AVEh sobreviveu mostrando a dificuldade de manejo destes pacientes. Sabe-se que 10% dos pacientes desenvolvem aneurisma intracraniano que predispõe ao AVEh. No entanto, só foi possível identificar o aneurisma como causa de AVEh no paciente sobrevivente. Por outro lado, o diagnóstico precoce de aneurisma associado à cirurgia, sugere que esta é uma boa alternativa de intervenção, apesar de ser apenas um caso. Anemia importante e leucocitose são apontados como fatores predisponentes para AVEh, enquanto doença renal, hipertensão arterial e coagulopatia são considerados fatores coadjuvantes. Em nossa casuística, apenas um paciente apresentava DRC e anemia grave (Hb = 5,0 g/dL), nenhum outro fator coadjuvante esteve presente nos demais pacientes. Leucocitose foi comum a todos os casos. A PRESS tem sido descrita em pacientes com DF que apresentam Síndrome Torácica Aguda e deve ser sempre considerada no diagnóstico diferencial das manifestações neurológicas em adultos. **Conclusão:** O AVEh é manifestação catastrófica e o diagnóstico precoce de aneurisma deve ser incentivado, em especial nos pacientes com cefaleia de aparecimento recente.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.078>

78

MICRORNAS ASSOCIADOS AO QUADRO CLÍNICO DA DOENÇA FALCIFORME



L.S.L. Sobreira^a, E.P. Rios^a, J.M. Costa^a, G.L.D. Santos^a, R.V. Garcia^a, M.C.S. Carvalho^a, E.D.C. Santos^a, T.A.B.S. Santana^a, T.C.C. Fonseca^b, L.C.G. Campos^a

^a Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA, Brasil

^b Grupo de Apoio à Criança com Câncer (GACC), Salvador, BA, Brasil

A doença falciforme (DF), um grupo de hemoglobinopatias, compreende uma das desordens monogênicas mais comuns no mundo. Diversos eventos fisiopatológicos são responsáveis pelas manifestações clínicas, porém, os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo são pouco conhecidos. Assim, este estudo objetivou identificar os principais microRNAs associados a mecanismos fisiopatológicos que constituem o quadro clínico da DF através de revisão sistemática. Para identificação das publicações foi realizada pesquisa bibliográfica nas bases de dados: MEDLINE/PUBMED e Scielo. A busca totalizou 75 artigos publicados entre 2015 a 2020, que foram avaliados por dois revisores atendendo os critérios de exclusão e inclusão pré-estabelecidos, sendo selecionados 8 artigos para elaboração desse estudo. A análise dos artigos incluídos nesta revisão demonstrou altos níveis de miR-144-3p e miR-144-5p frente a baixos índices de HbF em pacientes falcêmicos. Esses miRs também foram associados ao silenciamento de NRF2, relacionado à produção da cadeia de gama-globina. O miR-29B foi associado à transcrição de HBG-genes da gama globina-pela sua expressão aumentada nos pacientes com níveis elevados de HbF. Ao avaliar a gravidade clínica, o miR124-3p, miR-2278 e o miR-4763-5p foram associados a fenótipos mais graves. Além disso, os trabalhos apontam que o uso da hidroxiuréia(HU) está implicado na alteração de alguns miRs que atuam em genes reguladores da produção de hemoglobina fetal(HbF), como por exemplo, (1) no aumento da produção do miR-210 que está relacionado ao aumento da expressão dos genes da globina, sobretudo o HBG2; (2) na indução da expressão de miRS associados a inibição do gene BCL11A e MYB, como o miR-26b e o miR-151-3p e (3) na alteração da expressão de 13 miRs que são direcionados para os genes que regulam negativamente a HbF, a citar, BCL11a, MYB, KLF3 e SP1. Alguns estudos têm sugerido que a maioria dos miRs têm como alvo reguladores negativos da HbF. O uso dos miRs como potenciais biomarcadores genéticos de diagnóstico, prognóstico e opção terapêutica é cada vez mais comum em diversas doenças. A análise dos trabalhos mostrou que os miRs agem na expressão diferenciada de diversos genes, com destaque para o HBG, o BCL11A KLF-1, SP-1 E MYB. Os estudos selecionados evidenciaram que é necessário expandir o conhecimento acerca da relação clínica da doença falciforme com os microRNAs. Ademais, nosso estudo aponta o grande potencial dos miRs como marcadores moleculares da DF, da gravidade da doença e de resposta ao tratamento com HU. Desse modo, este estudo reforça a