



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

JORDY CUNHA PACHECO RIBEIRO

**INFLUÊNCIA DA HEMOGLOBINA S NA DISTRIBUIÇÃO DOS LINFÓCITOS B, T E
NATURAL KILLER: A INFLAMAÇÃO PODE SER INICIADA NO PORTADOR DE
TRAÇO FALCIFORME?**

ARACAJU – SE

2019

JORDY CUNHA PACHECO RIBEIRO

**INFLUÊNCIA DA HEMOGLOBINA S NA DISTRIBUIÇÃO DOS LINFÓCITOS B, T E
NATURAL KILLER: A INFLAMAÇÃO PODE SER INICIADA NO PORTADOR DE
TRAÇO FALCIFORME?**

Monografia apresentada ao Departamento de
Medicina da Universidade Federal de Sergipe,
como exigência parcial para a obtenção do grau de
bacharel em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Alves de Menezes
Neto

ARACAJU – SE

2019

JORDY CUNHA PACHECO RIBEIRO

**INFLUÊNCIA DA HEMOGLOBINA S NA DISTRIBUIÇÃO DOS LINFÓCITOS B, T E
NATURAL KILLER: A INFLAMAÇÃO PODE SER INICIADA NO PORTADOR DE
TRAÇO FALCIFORME?**

Monografia que será apresentada pelo aluno Jordy Cunha Pacheco Ribeiro ao Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe, como exigência para a obtenção do grau de bacharel em Medicina, sob orientação do Professor Dr. Osvaldo Alves de Menezes Neto.

Autor: Jordy Cunha Pacheco Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Alves de Menezes Neto

JORDY CUNHA PACHECO RIBEIRO

**INFLUÊNCIA DA HEMOGLOBINA S NA DISTRIBUIÇÃO DOS LINFÓCITOS B, T E
NATURAL KILLER: A INFLAMAÇÃO PODE SER INICIADA NO PORTADOR DE
TRAÇO FALCIFORME?**

Monografia que será apresentada ao Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe, como exigência para a obtenção do grau de bacharel em Medicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____

BANCA EXAMINADORA

Universidade Federal de Sergipe

Universidade Federal de Sergipe

Universidade Federal de Sergipe

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, Abilio e Sandra, por serem desde sempre a minha base, possibilitando que eu chegasse até onde cheguei, sempre com valores e virtudes indispensáveis. Agradeço a meu irmão, João Ribeiro, pelas inúmeras vezes que esteve ao meu lado durante toda a minha vida. Agradeço ao meu amor, Annie, por toda dedicação e apoio incondicionais que sempre definiram nossa relação.

Agradeço a meu orientador, Dr. Osvaldo Neto, pela dedicação com a qual me acolheu desde o início desse trabalho, pelas noites de plantão no Hospital São Lucas que me recebeu para resolver “esse e aquele” detalhes e pela amizade formada ao longo da elaboração dessa monografia.

Muito obrigado a todos que fizeram parte de mais esta etapa da minha carreira acadêmica.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

FIGURA 1 - Proporção de subpopulações de linfócitos B, T CD3+, T CD4 e T CD8, em termos percentuais, nos grupos de pacientes AA, AS e SS respectivamente.

FIGURA 2 - Proporção de células NK total, células NK CD56bright e células NK CD56dim, em termos percentuais, nos grupos AA, AS e SS respectivamente.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AF – Anemia falciforme

Células NK – Células *natural killer*

Células NKT – Linfócitos T que partilham características das células NK

CD3 – Composto multiproteico de diferenciação 3

CD4 – Composto multiproteico de diferenciação 4

CD56 – Antígeno de adesão glicoproteico 56

DAMP's – Padrões de hemólise associados a dano

DF – Doença falciforme

GLU – Glutamina

HbA – Hemoglobina A

HbA2 – Hemoglobina A2

HbF – Hemoglobina fetal

HbS – Hemoglobina falciforme

HbSC – variante genotípica heterozigótica para hemoglobinopatia SC

HbSS – descritor para homozigose para hemoglobina falciforme

IL-1-Beta – Interleucina 1 beta

IR – Isquemia-reperfusão

PAMP's – Padrões moleculares associados a patógenos

TF – Traço falciforme

VAL – Valina

SUMÁRIO

1. RESUMO	v
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1. HEMOGLOBINOPATIAS	9
2.2. ANEMIA FALCIFORME	10
2.3. FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME:	11
2.3.1. POLIMERIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA	11
2.3.2. VASO-OCCLUSÃO E HEMÓLISE	11
2.3.3. LESÃO ENDOTELIAL	12
2.3.4. INFLAMAÇÃO X HEMÓLISE	14
2.3.5. VASO-OCCLUSÃO X LINFÓCITOS E CÉLULAS NK	14
2.4. TRAÇO FALCIFORME	15
2.4.1. CONCEITO E EPIDEMIOLOGIA	15
2.4.2. REPERCUSSÕES CLÍNICAS: UM ESTADO BENIGNO?	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
3. ARTIGO ORIGINAL	23
3.1. INTRODUÇÃO	25
3.2. MÉTODOS	25
3.3. RESULTADOS	26
3.4. DISCUSSÃO	27
3.5. FIGURAS	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
4. APÊNDICE	33
4.1. APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCALRECIDO	33
5. ANEXO	35
5.1. ANEXO A - NORMAS DA REVISTA PEDIATRIC BLOOD AND CANCER – WILEY’S JOURNAL STYLE	35

1. RESUMO

INTRODUÇÃO: A inflamação crônica compõe a fisiopatologia da doença falciforme. O traço falciforme é considerado condição benigna e assintomática, contudo algumas complicações clínicas já foram descritas nesses pacientes.

OBJETIVOS: Verificar se presença hemoglobina S altera a distribuição de linfócitos B, linfócitos T e células Natural Killer em pacientes portadores de anemia falciforme e traço falciforme, quando comparados a indivíduos sem hemoglobinopatias.

MÉTODOS: Estudo transversal com pacientes adultos portadores de anemia falciforme (SS), indivíduos portadores de traço falciforme (AS) e indivíduos sem qualquer hemoglobinopatia (AA). Coletado sangue periférico e realizada imunofenotipagem para identificação dos linfócitos. O painel utilizado para avaliação de linfócitos B e T continha os seguintes anticorpos: CD3PECy7; CD4FITC, CD8PEcy5; CD14PE e CD19APCy7. Já para a identificação de células NK e subtipos foram utilizados os anticorpos CD3PEcy7; CD16APC, CD56BV421 e CD69APCy7. Os dados coletados foram tabulados no programa GraphPad Prism 7.00 e utilizados os testes Shapiro-Wilk, ANOVA e Kruskal-Wallis. **RESULTADOS:** Coletadas amostras de 20 indivíduos, dos quais seis do grupo SS, oito do grupo AS e seis do grupo AA; e 60% foram do sexo feminino. A análise dos linfócitos B e T não demonstrou diferença entre os grupos. Houve frequência significativamente menor de linfócitos T CD4+ no grupo SS em relação ao grupo AA. A análise de células NK totais demonstrou média maior nos grupos SS e AS quando comparados ao grupo AA. Quando analisados os subtipos de células NK, os grupos SS e AS apresentaram maior percentual de células NK imaturas quando comparadas ao grupo AA, sendo que ao analisar as células NK maduras, a diferença foi significativa apenas entre os grupos SS e AA. **CONCLUSÃO:** Ocorre diferença na distribuição dos linfócitos T e NK nos pacientes com HbS. Essas alterações no perfil inflamatório já estão presentes nos pacientes com traço falciforme, podendo justificar algumas das suas complicações clínicas.

Palavras chaves: anemia falciforme, traço falciforme, inflamação, linfócitos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HEMOGLOBINOPATIAS

Estudar as desordens relacionadas a hemoglobina tem servido de guia para muitos avanços na biologia celular e molecular, além de servir como base para o entendimento da fisiopatologia de algumas doenças genéticas. Hoje já existem descritas mais de 1000 hemoglobinopatias que afetam tanto o processo de síntese como o a própria estrutura da hemoglobina (THOM et al, 2013). Dentro desse conhecimento, é importante saber relacionar o genótipo ao seu respectivo fenótipo, com o intuito de entender realmente a fisiopatologia e os mecanismos por trás de tais doenças (FORGET; BUNN, 2013)

A hemoglobina tem grande importância no processo de homeostase do oxigênio e excreção de rejeitos metabólicos ácidos. Ela, em sua formação, consta de quatro subunidades (THOM et al, 2013). onde cada uma delas tende a formar uma ligação estável com um grupamento Heme (ferroprotoporfirina IX) que vai vir a se situar na porção externa da proteína, permitindo assim uma ligação reversível com os átomos de ferro. Além disso, é preciso que a concha onde se inserem os grupamentos Heme sejam suficientemente protetora para evitar que o íon Fe^{+2} oxide e transforme-se em Fe^{+3} , o qual é incapaz de se ligar ao oxigênio, impossibilitando o seu transporte por essa molécula.(DAILEY; MEISSNER, 2013).

O eritrócito em si tem que ser flexível o suficiente para o transporte do oxigênio via hemoglobina ser funcional. A hemoglobina precisa de um alto índice de solubilidade para que atinja níveis intracelulares adequadamente altos. (MCGANN, P. T. 2014). Sendo assim é de se esperar que, se todos esses processos dependem da tradução e transcrição de genes em proteínas, as mutações venham a ser um grande problema em toda a cadeia funcional da hemoglobina. Tais alterações genéticas, que como já citado, alteram tanto a síntese quanto o componente estrutural da hemoglobina levam a fenótipos bastante variados, que vão desde as talassemias aos diversos tipos de anemias, incluindo a anemia falciforme, onde a solubilidade da hemoglobina está deficiente, por exemplo. (FORGET; BUNN, 2013).

No adulto normal existem três tipos identificáveis de hemoglobina por meio de eletroforese. A hemoglobina A (HbA) corresponde a 95-98%, hemoglobina A2 que corresponde a 2-3%, hemoglobina fetal (hemoglobina F – HbF) presente ao nascimento e que tem sua concentração reduzida ao longo até os seis meses de vida, correspondendo a cerca de 1% do total (ZÚÑIGA et al, 2018)

2.2. ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme (AF) é uma condição integrante do espectro clínico da Doença Falciforme, uma desordem genética autossômica recessiva que afeta milhões mundialmente. (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2018). É tratada como a primeira doença descrita molecularmente, devido aos estudos de Linus Pauling publicados em 1949 na revista Science, que elaborou elegantes experimentos avaliando a dissimilaridade na hemoglobina de pacientes com anemia falciforme, através de estudos da mobilidade eletroforética – características muito antes inferidas porem difíceis de serem provadas (PAULING, L. et al, 1949).

No mundo, cerca de 3,2 milhões de pessoas vivem com Doença Falciforme, 43 milhões são portadores do traço genético (traço falciforme) e 176.000 morrem de complicações relacionadas a doença falciforme anualmente. (GBD MORTALITY AND CAUSES OF DEATH COLLABORATORS, 2013)

A AF caracteriza-se pelo aumento da concentração da hemoglobina falciforme (HbS) no sangue e corresponde a cerca de 70% da casuística da doença falciforme (PIEL, F. B. et al, 2010). A formação da HbS se dá por uma alteração genética, onde o sexto resíduo da beta-globina sofre uma substituição do seu aminoácido Glutamina, hidrofílico, pela Valina, hidrofóbico. (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Pacientes que apresentem homozigose para o alelo Beta-S (HbSS) ou herança compartilhada com outras mutações como HbSC e Beta-talassemia, por exemplo, podem apresentar aspectos clínicos e desfechos distintos, sendo de importância primordial a avaliação de tais aspectos (PAULING, L. et al, 1949).

Nesta revisão, serão abordados os principais temas que abrangem a fisiopatologia da AF: Polimerização da hemoglobina, vaso-oclusão, hemólise, inflamação estéril, lesão endotelial e ativação linfocitária.

2.3. FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME:

2.3.1. POLIMERIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA

A desoxigenação nos tecidos a partir da demanda específica promove a exposição de compostos hidrofóbicos específicos dos tetrâmeros de hemoglobina-S – HbS (FORGET; BUNN, 2013). Como resultado, diferentes resíduos desoxigenados de tetrâmeros distintos de HbS polimerizam-se afim de esconder tal resíduo hidrofóbico, e a partir forma-se então a cadeia intrincada de moléculas de HbS polimerizadas. (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010)

Alguns processos fisiopatológicos gerados a partir de tal polimerização da hemoglobina são: aumento da rigidez celular e distorção eritrocitários, falência energética celular e estresse oxidativo, desidratação, vaso-oclusão e hemólise intravascular prematura. (BARABINO; PLATT; KAUL, 2010).

A taxa de polimerização está relacionada diretamente com a concentração de HbS e em tese é inversamente proporcional a concentração de HbF. Sendo assim, se a polimerização está, em última análise, relacionada a desfechos clínicos, podemos dizer que a concentração de HbF está diretamente relacionada aos mesmos. (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2018).

2.3.2. VASO-OCCLUSÃO E HEMÓLISE

A vaso-oclusão é o evento predominantemente responsável pela crise algica sistêmica, sendo assim a maior responsável pelo atendimento médico de emergência a portadores de anemia falciforme. (MANWANI; FRENETTE, 2013). Já foi demonstrado que os mecanismos vaso-oclusivos estão intimamente relacionados a defeitos no fluxo de hemácias, além de contribuir para o fenômeno adesivo entre os eritrócitos e células inflamatórias, principalmente linfócitos, sendo também de grande importância sobre a lesão endotelial e estase venosa (ZHANG et al, 2016)

Para que a vaso-oclusão seja um fenômeno representativo nos desfechos já citados, é preciso mais do que apenas obstruir o fluxo sanguíneo. É necessário que

exista HbS polimerizada em quantidades suficientes, além de que a polimerização deve ocorrer num ritmo suficientemente rápido. Além disso, o fenômeno de aderência entre os eritrócitos, células inflamatórias e demais componentes do estresse oxidativo e da lesão endotelial subjacente tem papel importante na ocupação do lúmen microvascular (FERRONE, 2018). Dentro dos padrões fisiopatológicos associados com a anemia falciforme, existe a elevada formação de diversos tipos de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que de maneira intrínseca se associa com a hemólise intravascular patológica dos portadores de AF. (WAGENER et al 2003).

A hemólise vista da AF tem dois grandes grupamentos. A maior parte dela vem da dita hemólise extravascular, fato esse que ocorre devido à grande captação por macrófagos no baco e no sistema reticulo endotelial, identificando hemácias falcizadas. É válido ressaltar que por mais que ocorra isso de forma acentuada, o baço dos pacientes com anemia falciforme geralmente se apresenta pequeno, devido a formação de traves fibróticas secundárias as lesões de vaso-oclusão e isquemia-reperfusão. A hemólise intravascular, por sua vez, tem sua importância quando se fala em inflamação estéril da AF. A lise de hemácias no leito vascular é condição essencial para a liberação de fatores promotores de inflamação, os DAMPs (WAGENER et al 2003).

2.3.3. LESAO ENDOTELIAL

A ativação e lesão endotelial são processos de suma importância na fisiopatologia da AF. Eventos vaso-oclusivos de natureza subclínica podem ser explicados através de tal fisiopatologia. A partir do momento em que se falcizam hemácias em ambiente de estresse oxidativo, existe uma maior propensão a exposição de receptores de adesão com consequente liberação de conteúdo intracelular e posterior lesão endotelial. (KAUL; HEBBEL, 2000; FRENETTE; ATWEH, 2007).

Estudo com modelo animal já demonstrou que camundongos sujeitos a hipóxia seguida de reoxigenação tem fluxo de cisalhamento intravascular aumentado, sugerindo um componente inflamatório associado a adesão endotelial. A posterior infusão de anticorpo anti-p-selectina inibiu completamente qualquer resposta

inflamatória, ratificando ainda mais a hipótese inflamatória-endotelial. (KAUL; HEBBEL, 2000)

O sistema imunológico humano, conceitualmente, é dividido em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata enquanto resposta inicial é rápida e estereotipada, sendo motivada por diversos estímulos. Ela é representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis presentes em todos os indivíduos independente de contato prévio com agentes agressores. (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; CRUNIVEL et al, 2010).

As principais células que representam essa parte da imunidade humana são os macrófagos, neutrófilo, células dendríticas e as células NK. Tais células são efectoras de diversos processos, como liberação de mediadores inflamatórios, proteínas de fase aguda, citocinas e ativação do complemento. É evidente a ativação desse sistema a partir de moléculas estrangeiras ao ser humano, ou seja, que não fazem parte dele mesmo. Lipopolisacarídeos, manose e ácido teicoico, encontrados na superfície de diversos micro-organismos constituem os chamados padrões moleculares associados a patógenos, ou PAMP's. (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; CRUNIVEL et al, 2010).

Dentro de todo intrincado sistema de células que fazem parte do sistema imune inato, para essa revisão dá-se mais importância às células NK, ou *natural killers*. Elas originam-se na medula óssea e constituem a fração mononuclear do sangue, com 5% a 20% de participação em sua constituição. São importantes pois seu poder citotóxico se faz essencial ao reconhecer e listar células infectadas por vírus, bactérias e protozoários, além de células tumorais. Além disso, também fazem parte do processo de ativação de linfócitos B e T. (CERWENKA; LANIER, 2001; YOKOYAMA; KIM; FRENCH, 2004).

As células NK quando analisada quanto ao seu aspecto fenotípico, são identificadas pelo marcador CD56 e ausência de CD3, diferentemente dos linfócitos T que são CD56 positivos e CD3 também positivo (PATAH 2016).

2.3.4. INFLAMAÇÃO X HEMÓLISE

Dentro dos padrões fisiopatológicos associados com a anemia falciforme, existe a elevada formação de diversos tipos de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que de maneira intrínseca se associam com a hemólise intravascular patológica dos portadores de AF. (MENDOÇA; SILVEIRA; CONRAN, 2016)

A hemólise enquanto processo destruidor de hemácias, promove liberação de DAMPs no intralúmen, e estes têm papel desencadeador de inflamação, caso não sejam neutralizados. A esse processo damos o nome de inflamação “estéril”. Dentre grande parte dos DAMPs liberados na corrente sanguínea, o grupamento heme – molécula hidrofóbica amplamente citada acima – tem seu destaque, uma vez que faz parte de processo como ativação de leucócitos, com migração e adesão dos mesmos, além de aumentar a expressão de citocinas envolvidas em oxidação e peroxidação de múltiplas moléculas. É de vital importância a formação do inflamassoma em macrófagos – composto multiproteico intracitosólico - pelo grupamento Heme. O inflamassoma é o precursor e o ditador da liberação de algumas citocinas, como a IL-1-BETA. (MENDOÇA; SILVEIRA; CONRAN, 2016; DUTRA et al 2014; DUTRA; BOZZA, 2015).

2.3.5. VASO-OCCLUSÃO X LINFÓCITOS E CÉLULAS NK

A lesão de isquemia-reperfusão (IR), já discutida nesta revisão, se mostrou em estudos com modelo animal como tendo influência na ativação de leucócitos, bem como na sua migração e adesão. Nesses processos, as evidências já demonstram que as células NK são imprescindíveis para a propagação da cascata inflamatória da lesão de IR sendo mecanismo vital na fisiopatologia da anemia falciforme. (CASTRO et al, 1994).

Em modelo animal, mostrou-se a elevação da adesão e da migração de leucócitos a lesão após isquemia (FIELD; NATHAN; LINDEN, 2001). Outro estudo realizado em 2005 mostrou que a lesão de isquemia-reperfusão a nível hepático estava em associação direta com a expansão da ativação de células NK. Sendo

assim, atribui-se as células NK o papel de intermediadores no processo de isquemia-reperfusão e inflamação estéril. (SHIMAMURA et al, 2005).

Estudos recentes já demonstraram que as células NK invariáveis se mostraram mais ativas e numerosas, além de serem promotoras de inflamação pulmonar e disfunção generalizada em pacientes com AF. A sua diminuição ou depleção geral nesses pacientes pode trazer melhoras clínicas significativas (FIELD; NATHAN; LINDEN, 2001)

Quanto a classificação no processo de maturação das células NK, vemos dois grupos principais. Elas podem ser divididas em células CD56bright, consideradas imaturas, produtoras de altas dosagens de interferon gama porém com baixa capacidade citotóxica; e em células CD56dim, consideradas maduras e com altas taxas de citotoxicidade. (COOPER et al 2001; VIVIER et al 2008; SPAGGIARI et al, 2008).

2.4. TRAÇO FALCIFORME

2.4.1. CONCEITO E EPIDEMIOLOGIA

Traço Falciforme (TF) refere-se à herança genética heterozigótica denominada como HbAS, e comumente é tratado como um estado benigno e assintomático. (KOTILA, 2016). A prevalência do traço falciforme é mais alta entre a população africana, tendo certos países como a Nigéria, Libéria, Gana e Uganda números entre 10% e 30% (OMOTADE et al., 1998; TUBMAN et al., 2016). Entre recém-nascidos dos Estados Unidos vemos números entre 1,5% e 8%, chegando a 10% no Brasil e na Jamaica (THERRELL et al. 2015; LERVOLINO et al. 2010) Estudos populacionais demonstram prevalências de até 20-40% em certas tribos africanas, populações do Mediterrâneo e grupos aborígenes. (LEDERBERG, 1999)

2.4.2. REPERCUSSÕES CLÍNICAS: UM ESTADO BENIGNO?

Durante muito tempo acreditou-se que a condição de traço falciforme seria benigna e até assintomática. Porém, a literatura científica vem mostrando correlação

entre o TF e algumas condições clínicas, merecendo destaque a doença renal crônica em estágio avançado (ALLADAGBIN et al. 2018), morte súbita (MITCHEL, 2018; MEASE; LONGO; HAKAMI, 1976; KARK et al., 1987), doença vaso-oclusiva (SAXENA et al. 2015) e retinopatia diabética (HARBI et al. 2016), muitos desses notados em atléticas com alto rendimento, onde pode existir baixa oxigenação tecidual (QUATTRONE RD et al. 2015)

A doença renal crônica pode surgir mediante condições que gerem hipóxia renal, e por sua vez pode ser agravada em pacientes com TF (QUATTRONE RD et al. 2015). Estudos revelaram que pacientes com TF apresentaram maior prevalência de albuminúria, menor taxa de filtração glomerular e maior incidência de doença renal crônica (NAIK et al. 2014). Um estudo nacional revelou que pacientes com doença renal em estágio avançado que estavam em hemodiálise tinham uma maior frequência de TF (ALLADAGBIN et al. 2018).

A associação entre TF e morte súbita ainda parece obscura. Estudos recentes demonstraram correlação entre tais fatores naqueles indivíduos submetidos a estresse físico extenuante (QUATTRONE RD et al. 2015). Estudo realizado Mitchel em 2018 trouxe que indivíduos que desejam ou serão submetidos a qualquer tipo de exercício extenuante devem ter seus níveis de hemoglobina S dosados. Devido a fatores com desidratação, estresse oxidativo elevado, altitude, altas temperaturas e condicionamento físico baixo, a viscosidade sanguínea seria alterada, levando a mais falcização intravascular, propiciando a mais eventos microvasculares e até a morte súbita.

Em contrapartida, estudo realizado por Harbi e colaboradores em 2016 mostrou que pacientes diabéticos com TF tinham prevalências significativamente menores de edema macular diabético e retinopatia proliferativo diabética se comparados com pacientes diabéticos que não eram portadores de TF.

Ainda não se sabe se as alterações clínicas nos pacientes com TF podem estar relacionadas com a presença da hemoglobina S e consequentemente com ativação da inflamação crônica. Dessa forma, este estudo tem por objetivo avaliar o perfil de linfócitos B, linfócitos T (auxiliar e citotóxico) e NK em pacientes portadores da

hemoglobina S (anemia e traço falciforme) e comparar com indivíduos sem quaisquer hemoglobinopatia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLADAGBIN, D. J. et al. The sickle cell trait and end stage renal disease in Salvador, Brazil. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. 1–11, 2018.

BARABINO, G. A.; PLATT, M. O.; KAUL, D. K. Sickle Cell Biomechanics. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 12, n. 1, p. 345–367, 2010.

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.

CERWENKA, A.; LANIER, L. Natural killer cells, viruses and cancer. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.41-49, out. 2001. Springer Nature

COOPER, M. A. et al. Human natural killer cells : a unique innate immunoregulatory role for the CD56 bright subset Human natural killer cells : a unique innate immunoregulatory role for the CD56 bright subset. **Immunobiology**, v. 97, n. 10, p. 3146–3151, 2013.

CRUVINEL, W. DE M. et al. Immune system - part I fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 443–461, 2010.

DAILEY, H. A.; MEISSNER, P. N.. Erythroid Heme Biosynthesis and Its Disorders. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 3, n. 4, 7 mar. 2013

DUTRA, F. F. et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 39, p. E4110–E4118, 2014.

DUTRA, F. F.; BOZZA, M. T. Heme on innate immunity and inflammation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 MAY, n. May, p. 1–20, 2014.

FERRONE, F. A. Targeting HbS Polymerization. **Seminars in Hematology**, v. 55, n.

2, p. 53–59, 2018.

FIELD, J. J.; NATHAN, D. G.; LINDEN, J. Targeting iNKT cells for the treatment of sickle cell disease. **Clinical Immunology**, v. 140, n. 2, p. 177–183, 2011.

FORGET, B. G.; FRANKLIN BUNN, H. Classification of the disorders of hemoglobin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 2, p. 1–12, 2013.

FRENETTE, P. S. et al. Sickle cell disease : old discoveries , new concepts , and future promise Find the latest version : Science in medicine Sickle cell disease : old discoveries , new concepts , and future promise. v. 117, n. 4, p. 850–858, 2007.

HARBI, M. AL et al. Association between sickle cell trait and the prevalence and severity of diabetic retinopathy. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–8, 2016.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 197–216, 2002.

KARK, J.A. et al. Sickle cell trait as a risk factor for sudden death in physical training. **N Engl J Med** 1987; 317: 781–787.

KAUL, D. K.; HEBBEL, R. P. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 3, p. 411–420, 2000.

KOTILA, T. R. Sickle Cell Trait: A Benign State? **Acta Haematologica**, v. 136, n. 3, p. 147–151, 2016.

LEDERBERG, J. J.B.S. Haldane (1949) on infectious disease and evolution. **Genetics**. 1999;153:1–3

LERVOLINO, L.G. et al.: Prevalence of sickle cell trait in national neonatal screening studies. **Rev Bras Hematol Hemoter** 2010; 33:49–54.

MANWANI, D.; FRENETTE, P. S. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2013, p. 362–369, 2013.

MCGANN, P. T. Sickle cell anemia: An underappreciated and unaddressed contributor to global childhood mortality. **Journal of Pediatrics**, v. 165, n. 1, p. 18–22, 2014.

MEASE, A. D., LONGO, D. L., HAKAMI, N.: Sicklemia and unexpected death in sickle cell trait: observations of five cases. **Mil Med** 1976; 141: 470–473.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate Immunity. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 343, n. 5, p.338-344, 3 ago. 2000. Massachusetts Medical Society

MENDONÇA, R.; SILVEIRA, A. A. A.; CONRAN, N. Red cell DAMPs and inflammation. **Inflammation Research**, v. 65, n. 9, p. 665–678, 2016.

MITCHELL, B. L. Sickle Cell Trait and Sudden Death. **Sports Medicine - Open**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.1-6, 23 maio 2018. Springer Nature

NAIK, R. P. et al. Association of Sickle Cell Trait With Chronic Kidney Disease and Albuminuria in African Americans. *Jama*, [s.l.], v. 312, n. 20, p.2115-2126, 26 nov. 2014. American Medical Association (AMA).

NOVELLI, E. M.; GLADWIN, M. T. Crises in sickle cell disease. **Chest**, v. 149, n. 4, p. 1082–1093, 2016.

OMOTADE, O. O. et al. Routine screening for sickle cell haemoglobinopathy by electrophoresis in an infant welfare clinic. **West Afr J Med.**, Nigéria, v. 2, n. 17, p.91-94, abr. 1998

PAULING, L. et al. Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15395398>. v. 110, n. 543, 1949.

PATAH, P. A. Análise do perfil imunofenotípico das células NK e sua correlação com a expressão de PD--1 e PD--L1 em indivíduos infectados pelo HIV. Tese apresentada à Faculdade de São Paulo. 2016.

PIEL, F. B. et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. **Nature Communications**, v. 1, n. 8, 2010.

QUATTRONE, R. D. et al. Exercise collapse associated with sickle cell trait (ECAST): case report and literature review. **Curr Sports Med Rep** 2015; 14: 110–116.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, [s.l.], v. 376, n. 9757, p.2018-2031, dez. 2010. Elsevier BV.

SAXENA P. et al. Sickle cell trait causing splanchnic venous thrombosis. Case Reports **Hepatol** 2015; 2015: 743289.

SHIMAMURA, K. et al. Association of NKT cells and granulocytes with liver injury after reperfusion of the portal vein. **Cellular Immunology**, v. 234, n. 1, p. 31–38, 2005.

SPAGGIARI, G. M. et al. 2011 - cytotoxicity , and cytokine production role of indoleamine Mesenchymal stem cells inhibit natural killer – cell proliferation , cytotoxicity , and cytokine production role of indoleamine 2 , 3-dioxygenase and prostaglandin E2.pdf. v. 111, n. 3, p. 1327–1334, 2018.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease - Elsevier Medical Artwork. **Annual Review of Pathology**, n. October, p. 261–290, 2018.

THERRELL, B. L. Jr., LLOYD-PURVEAR, M. A., ECKMAN, J. R.: Newborn screening for sickle cell disease in the United States: a review of data spanning 2 decades. **Semn Perinatal** 2015; 39: 238–251.

THOM, C. S. et al. Hemoglobin Variants: Biochemical Properties and Clinical Correlates. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 3, n. 3, 6 fev. 2013.

TUBMAN, V. N., MARSHALL, R., JALLAH, W.: Newborn screening for sickle cell disease in Liberia: a pilot study. **Pediatr Blood Cancer** 2016; 63:671–676.

VIVIER, E. et al. Functions of natural killer cells. **Nature Immunology**, v. 9, n. 5, p. 503–510, 2008.

WAGENER, F. A. D. T. G. et al. Different Faces of the Heme-HO System. **New York**, v. 55, n. 3, p. 551–571, 2003.

WANG, H. et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1459–1544, 2016.

YOKOYAMA, W. M.; KIM, S.; FRENCH, A. R. The Dynamic Life of Natural Killer Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 405–429, 2004.

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

ZÚÑIGA C., P. et al. Enfermedad de células falciformes: Un diagnóstico para tener presente. **Revista chilena de pediatría**, v. 89, n. ahead, p. 0–0, 2018.

3. ARTIGO ORIGINAL

ARTIGO ORIGINAL

A influência da hemoglobina S na distribuição dos linfócitos B, T e natural killer: a inflamação pode ser iniciada no portador de traço falciforme?

Autores:

Oswaldo Alves de Menezes Neto

Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe

Priscila Oliveira Percout

Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe

Jordy Cunha Pacheco Ribeiro

Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe

Rosana Cipolotti

Professora Associada do Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe

Não há conflito de interesses neste artigo

Abstract:

Cronic inflammation is an aspect of the pathophysiology of the sickle cell disease. Sickle cell trait is considered to be a benign and asymptomatic condition; however, some clinical outcomes have already been associated. In this study, where included patients with sickle cell anemia, sickle cell trait and those without an hemoglobinopathy. Immunophenotyping was done for the segregation of B lymphocytes, T lymphocytes (CD4+ and CD8+) and NK cells. Patients with sickle cell anemia and trait had more total NK e NK CD56^{bright} and those with sickle cell anemia had greater values of CD56^{dim} with reduced amount of CD4+ T lymphocytes.

Key-words: Sickle cell anemia; sickle cell trait; inflammation; lymphocytes

Resumo:

A inflamação crônica compõe a fisiopatologia da doença falciforme. O traço falciforme é considerado condição benigna e assintomática, contudo algumas complicações clínicas já foram descritas nesses pacientes. No estudo foram incluídos pacientes portadores de anemia falciforme, traço falciforme e indivíduos sem quaisquer hemoglobinopatias. Realizada imunofenotipagem de sangue periférico para avaliação de linfócitos B, linfócitos T (CD4 e CD8) e células NK (CD^{bright} e CD^{dim}). Pacientes com anemia falciforme e traço falciforme apresentaram valores aumentados de NK total e NK CD56^{bright}; e apenas pacientes com anemia falciforme apresentaram valores maiores de NK CD56^{dim} e menores de linfócitos CD4+.

Palavras chaves: anemia falciforme, traço falciforme, inflamação, linfócitos.

3.1. INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma desordem genéticas que acarreta na polimerização da hemoglobina e repercute clinicamente com hemólise, vaso-occlusão e inflamação^[1]. As hemácias anormais apresentam alterações estruturais na membrana que, além de obstruírem a microcirculação, provocam lesão endotelial com inflamação, liberação de interleucinas e expressão de moléculas de adesão.^[2]

Atualmente já se compreende que na vaso-occlusão e nas suas repercussões clínicas estão envolvidas interações complexas entre o eritrócito, o endotélio e leucócitos^[3]. Em modelos animais já se observou que a lesão de isquemia-reperfusão da AF promove elevação de citocinas associadas à atividade de células Natural Killer (NK)^[4]. Deste modo, acredita-se que as células T e NK são fundamentais nos fenômenos clínicos da AF.

Durante muito tempo acreditou-se que a condição de traço falciforme (TF) seria benigna e até assintomática. Porém, a literatura vem mostrando correlação entre o TF e algumas complicações clínicas, como doença renal crônica em estágio avançado^[5], morte súbita ^{[6][7]}, doença vaso-oclusiva ^[8] e retinopatia diabética^[9].

Dessa forma, este estudo tem por objetivo avaliar o perfil de linfócitos B, linfócitos T (auxiliar e citotóxico) e NK em pacientes portadores da hemoglobina S (AF e TF) e comparar com indivíduos sem quaisquer hemoglobinopatia.

3.2. MÉTODOS

Foram incluídos pacientes adultos portadores de AF, indivíduos portadores de TF e indivíduos sem quaisquer hemoglobinopatias, confirmados por eletroforese de hemoglobina. Foram excluídos da pesquisa, pacientes com crise algica, infecção ou internação nas quatro semanas que precederam a coleta; quaisquer indivíduos com histórico de transfusão sanguínea nos 120 dias que antecederam a coleta; pacientes em uso de hidroxiuréia; pacientes com doenças nas últimas quatro semanas ou com uso de anti-inflamatórios nas 24 horas antes da coleta.

Para a obtenção dos linfócitos foi coletado sangue periférico, seguido de isolamento de células mononucleares e imunofenotipagem em citômetro de fluxo de oito cores. O painel utilizado para avaliação de linfócitos B e T continha os seguintes anticorpos: CD3PECy7; CD4FITC, CD8PEcy5; CD14PE e CD19APCy7. Já para a identificação de células NK foram utilizados os anticorpos CD3PECy7; CD16APC, CD56BV421 e CD69APCy7. No painel sem a coloração CD16, as células NK foram identificadas como linfócitos CD3- que eram brilhantes (CD^{bright}) ou escuros (CD^{dim}) para a coloração de CD56.

Os dados coletados foram tabulados no programa GraphPad Prism 7.00. Para a análise de distribuição das variáveis foi utilizado o teste Shapiro-Wilk e observou-se que todas as variáveis tinham distribuição normal, exceto a variável Linfócitos T CD4 no grupo AS. A comparação das médias entre os diferentes grupos foi realizada pelos testes ANOVA ou Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

3.3.RESULTADOS

Foram coletadas amostras de 20 indivíduos, dos quais seis eram portadores de AF (grupo SS), oito de TF (grupo AS) e seis indivíduos não possuíam quaisquer hemoglobinopatias (grupo AA). Doze indivíduos (60%) eram do sexo feminino e a média de idade dos indivíduos foi de 30,8 anos ($20-39 \pm 5,43$).

Ao analisar a porcentagem dos linfócitos B e linfócitos T entre os grupos não foram encontradas diferenças. A figura 1 contém a distribuição dos linfócitos B (AA=5,4% $\pm$ 1,1; AS=4,7% $\pm$ 2,0; SS=3,4% $\pm$ 3,1) e linfócitos T (AA=74,7% $\pm$ 6,85; AS=63,6% $\pm$ 10,9; SS=55,6% $\pm$ 16,0) entre os grupos.

Didaticamente as subpopulações dos linfócitos T são denominados como T CD4+ e T CD8+. Na amostra houve menor frequência percentual dos linfócitos T CD4+ entre os pacientes portadores de AF comparados com os pacientes sem hemoglobinopatias, contudo sem diferenças nas demais associações entre os grupos (AA=47,3% $\pm$ 6,3; AS=41,0% $\pm$ 6,2; SS=33,7% $\pm$ 8,4). Já nos linfócitos T CD8+ não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (AA=21,5% $\pm$ 7,7; AS=16,2% $\pm$ 3,6; SS=15,0% $\pm$ 7,7) conforme demonstrado na figura 1.

A distribuição dos linfócitos NK e seus subtipos encontra-se na figura 2. O percentual dos linfócitos NK foi maior entre os pacientes com AF e TF comparados com os pacientes sem HbS (AA=10,3% $\pm$ 3,7; AS=20,4% $\pm$ 6,9; SS=22,1% $\pm$ 9,7). Não foi encontrada diferença entre os grupos de pacientes que são portadores da HbS (AS e SS).

Entre os subtipos de linfócitos NK foram analisadas as distribuições percentuais dos linfócitos NK CD56^{bright} (imaturos) e CD56^{dim} (maduros). Os pacientes portadores de HbS (AA e AS) apresentaram percentual maior de linfócitos NK imaturos, quando comparados com os não portadores (AA=0,29% $\pm$ 0,13; AS=0,92% $\pm$ 0,56; SS=1,29% $\pm$ 0,79). Quando observados os linfócitos NK maduros foi encontrada diferença apenas entre os grupos com AF e sem hemoglobinopatias (AA=9,4% $\pm$ 3,6; AS=17,7% $\pm$ 6,9; SS=19,5% $\pm$ 6,9), conforme apresentado na figura 2.

3.4.DISCUSSÃO

O entendimento completo da fisiopatologia da doença falciforme (DF) é um desafio desde sua descrição. A hemólise e a vasclusão decorrente da polimerização da HbS não explicam a variabilidade clínica da anemia falciforme ^[1]. Atualmente a associação com processo inflamatório, liberação de DAMPS, lesão isquemia-reperfusão, lesão endotelial e ativação de células Natural Killer T (NKT), podem ajudar a explicar uma doença de amplo espectro clínico com risco de múltiplas disfunções orgânicas.^[10]

Estudo realizado por Dahmani *et al*, em 2016^[11], evidenciou leucocitose em 64,4% dos pacientes com AF^{[11][12]}. Em crianças com AF a contagem de leucócitos é fator de risco para ocorrência de complicações agudas tais como acidente vascular encefálico, síndrome torácica aguda e crises álgicas de repetição^[13]. Além disso leucocitose já foi relacionada com redução da capacidade vital pulmonar nos pacientes com AF^[11].

Apesar do papel da leucocitose estar bem relacionado com a gravidade na AF, o papel dos linfócitos T não foi totalmente definido. A distribuição dos linfócitos

T CD3+, CD4+ e CD8+ é diferente em diversos estudos. Inicialmente foi observado maior número de linfócitos T CD3+ e CD8+ em pacientes com AF, sem diferença nos valores de CD4+[14]. O estudo realizado por Musa *et al* em 2010[15] não evidenciou diferença na contagem de linfócitos CD3+ e CD8+, porém observou valor menor de linfócitos CD4. ElAlfy *et al*, em 2018[12] encontrou valores maiores de linfócitos T e CD4+ nos pacientes com doença falciforme, contudo a amostra do estudo tinha pacientes com AF (com e sem uso de hidroxiureia) e heterozigotos com beta talassemia. No presente estudo os pacientes com AF apresentaram valores menores de linfócitos CD4+ quando comparados com indivíduos saudáveis.

Os linfócitos T atuam na resposta imune específica regulando-a através de produção de citocinas, promovendo dois tipos de resposta imune: TH1 e TH2. Alguns autores defendem que o desequilíbrio entre a resposta TH1 X TH2 poderiam justificar as diferenças de resposta e evolução clínica na AF[16]. Talvez a relação de leucocitose e gravidade da doença possa estar relacionada com a ativação de outros subtipos de leucócitos, como monócitos, neutrófilos ou células NK, durante a resposta inflamatória.

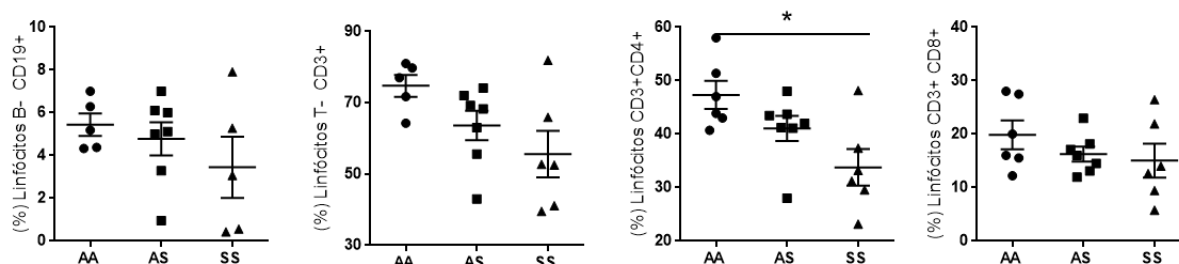
Já com relação às células NK, foi demonstrado que as células NKT têm participação significativa no processo inflamatório que ocorre na crise de vaso-oclusão falcêmica e que seu bloqueio diminui a inflamação e lesão pulmonar em modelos animais.[17][4]. Os pacientes com AF apresentam valores maiores de células NK comparado com pessoas normais[12] e em um estudo se observou normalização dos valores ao se utilizar terapias modificadoras da doença[18]. No atual estudo foi encontrado valor maior das células NK nos pacientes com AF e nos portadores de TF. Esse dado enfatiza que a alteração no processo inflamatório pode se iniciar nos pacientes assintomáticos portadores de TF. Na literatura os valores de células NK na DF está diretamente relacionada com valores de HbS, contudo portadores de traço não foram estudados anteriormente[12].

As células NK são divididas em CD56^{bright} e CD56^{dim} com diferença na expressão de perforina, capacidade citotóxica e modo de ativação. As células CD56^{bright} são consideradas imaturas por apresentarem baixa capacidade citotóxica e maior produção de citocinas. Em oposição as células CD56^{dim} têm grande

capacidade citotóxica com menor produção de citocinas^{[19][20]}. No presente estudo foram encontrados valores maiores de CD56^{bright} em pacientes portadores de HbS (AF e TF) comparados com indivíduos sem hemoglobinopatias sugerindo a possível participação dessas células na fisiopatologia da DF. O CD56^{dim} foi maior apenas nos pacientes homozigotos (SS) corroborando um estudo que encontrou valores maiores dessas células em pacientes com AF comparados com pessoas normais e falcêmicos em uso de hidroxiuréia^[18].

Os resultados apresentados neste estudo apontam para a participação de linfócitos T e células NK na fisiopatologia da AF, sugerindo que o estado inflamatório já ocorre em pacientes assintomáticos portadores de TF. A influência da inflamação nos portadores de HbS pode explicar as complicações já descritas nesses pacientes heterozigotos (TF) e poderá identificar novas terapias ou marcadores de prognósticos.

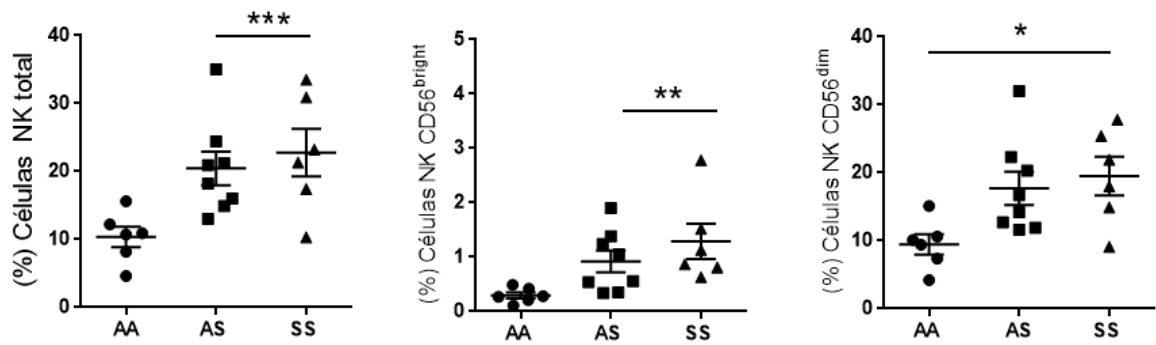
3.5. FIGURAS



AA= indivíduos sem hemoglobinopatia, fenótipo A1A2. AS= indivíduos com traço falciforme, fenótipo A1S, SS= indivíduos portadores de anemia falciforme.

* Diferença significativa entre as médias de linfócitos T CD4 entre grupo AA e SS, com $p=0,041$.

Figura 1: Proporção de subpopulações de linfócitos B, T CD3+, T CD4 e T CD8, em termos percentuais, nos grupos de pacientes AA, AS e SS respectivamente.



AA= indivíduos sem hemoglobinopatia, fenótipo A1A2. AS= indivíduos com traço falciforme, fenótipo A1S, SS= indivíduos portadores de anemia falciforme.

*** Diferença significativa entre as células NK total entre o grupos AA e SS: $p=0,021$, AA e AS: $p=0,033$

** Diferença significativa entre as células NK CD56^{bright} entre grupo AA e SS: $p=0,0054$, AA e AS: $p=0,042$.

* Diferença significativa entre as células NK CD56^{dim} entre grupo AA e SS com $p=0,038$

Figura 2: Proporção de células NK total, células NK CD56^{bright} e células NK CD56^{dim}, em termos percentuais, nos grupos AA, AS e SS respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Antonio, M.; Silva AC, P. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007. ISSN 1516-8484 1806-0870.
2. Orah SP. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. The Journ of Clin Investig. 2000; 106 (3): 337-338.
3. Hambalu AI, Musa BO, Onyemelukwe GC, Hambolu JO, Mamman AI., Isa AH. Pattern of serum cytokine expression and T-cell subsets in sickle cell disease patients in vaso-occlusive crisis. Clin Vaccine Immunol. 2010; 17 (4): 602-608.
4. Wallace KL, Linden J. Adenosine A2A receptors induced on iNKT and NK cells reduce pulmonary inflammation and injury in mice with sickle cell disease. Blood. 2010; 116 (23): 5010-5020.
5. Alladagbin DJ, Fernandes PN, Tavares MB, Brito JT, Oliveira GGS, Silva LK, et al. The sickle cell trait and end stage renal disease in Salvador, Brazil. PLoS ONE, 2018, 13 (12):e0209036.
6. Mitchell BL. Sickle cell trait and sudden death. Mitchell Sport Medicine – Open, 2018, 4:19.
7. Kark, JA et al. Sickle cell trait as a risk factor for sudden death in physical training. N Engl J Med 1987; 317: 781–787.
8. Saxena, P. et al. Sickle cell trait causing splanchnic venous thrombosis. Case Reports Hepatol 2015; 2015: 743289.
9. Al Harbi M, Khandekar R, Kozak I, Schatz P. Association between sickle cell trait and the prevalence and severity of diabetic retinopathy. PLoS ONE, 2016, 11(7):e0159215.
10. Sundd, P.; Gladwin, M. T.; Novelli, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease - Elsevier Medical Artwork. Annual Review of Pathology, n. October, p. 261–290, 2018.
11. Dahmani F, Benkirani S, Kouzi J, Woumki A, Mamad H, Masrar A. Evaluation of hemogram in patients with homozygous sickle cell disease: about 87 cases. The Pan African Medical Journal, 2016, 25:240-240.
12. El Alfy MS, Adian AAM, Ebeid FSE, Eissa DS, Ismail EAR, et al. Immunological role of CD4+ CD28 null T lymphocytes, natural killer cells, and interferon-gamma in

pediatric patients with sickle cell disease: relation to disease severity and response to therapy. *Immunologic Research*. 2018, Aug; 66(4): 480-490.

13. Quinn C, Lee NJ, Shull EP, Ahmad N, Rogers ZR, Buchanan GR. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell anemia: a study of the Dallas Newborn Cohort. *Blood*, 2008, 111(2):544-548

14. Koffi KG, Sawadogo D, Meite M, Nanho DC, Tanoh ES, Attia AK, Sanogo I, Sangare A. Reduced levels of T-cell subsets CD4p and CD8p in homozygous sickle cell anemia, patients with splenic defects. *The Hematology Journal*, 2003, 4:363-365.

15. Hambalu AI, Musa BO, Onyemelukwe GC, Hambolu JO, Mamman AI., Isa AH. Pattern of serum cytokine expression and T-cell subsets in sickle cell disease patients in vaso-occlusive crisis. *Clin Vaccine Immunol*. 2010; 17 (4): 602-608.

16. Onyemelukwe GC, Musa BO. T-lymphocyte subsets in patients with hookworm infection in Zaria, Nigeria. *African journal of medicine and medical sciences*, 2001, 30(4): 255-259.

17. Wallace KL, Marshal MA, Ramos SI, Lannigan JA, Field JJ, Strieter RM, Linden J. NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN- γ and CXCR3 chemokines. *Blood*, 2009, 114(3):667-676.

18. Abraham AA, Lang H, Meier ER, Nickel RS, Dean M, et al. Characterization of natural killer expressing markers associated with maturity and cytotoxicity in children and young adults with sickle cell disease. *Pediatric Blood & Cancer*, 2019, 66:e27601.

19. Cooper, MA. et al. Human natural killer cells : a unique innate immunoregulatory role for the CD56 bright subset Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 bright subset. *Immunobiology*, v. 97, n. 10, p. 3146–3151, 2013.

20. Vivier, E. et al. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, v. 9, n. 5, p. 503–510, 2008.

4. APÊNDICE

4.1. APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCALRECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, pesquisadores da Universidade Federal de Sergipe, pedimos sua autorização para sua participação na pesquisa: **“A avaliação do perfil de linfócitos T e NK em pacientes portadores de Doença Falciforme”**, a realizar-se no Ambulatório de Hematologia Pediátrica do Hospital Universitário – UFS, que tem o objetivo identificar o mecanismo de lesão relacionados a crise de vaso-oclusão nos pacientes portadores de Doença, como é o seu caso.

Caso concorde com a participação, nós pediremos para responder algumas perguntas como: nome, idade, endereço, bem como sobre a doença.

A avaliação dos subtipos de linfócitos será realizada a partir do sangue periférico, que tem como único incomodo a punção de veia para coleta de sangue, o procedimento tem risco de formação de hematoma com dor local, este risco será minimizado a partir da realização do procedimento por profissional experiente. Caso algum evento esteja relacionado a punção, a avaliação, orientação e conduta serão dadas pelo pesquisador responsável.

Nós nos comprometemos informar os resultados dos exames e orientá-los sobre o significado dos achados, além de mantermos sigilo e confidencialidade sobre a sua participação nesse estudo.

Caso o senhor (a) não queira a participar, saiba que isso não alterará o tratamento que vem sendo feito aqui no Ambulatório Hematologia Pediátrica, no entanto a sua participação é muito importante para nosso estudo. Isso porque estará contribuindo para a evolução dos conhecimentos sobre anemia falciforme. A sua participação é voluntária e você poderá interrompê-la a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

Em caso de dúvida entre em contato conosco nos locais, dias e horários em que os atendimentos são realizados.

Dra. Priscila: 79-99807-2097

Dr. Osvaldo: 79-99971-0121

Dra Rosana: 79-99981-1238

Acadêmico Jordy Ribeiro: 79-99860-2996

Diante do que foi dito, confirmo a minha participação:

Assinatura

Aracaju, __ de _____ de 2016

Os investigadores principais, Dra Rosana Cipolotti e Dra. Priscila Oliveira Percout, comprometem-se a conduzir todas as atividades deste estudo de acordo com os termos do presente Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador responsável

Aracaju, __/__/____

5. ANEXO

5.1. ANEXO A - NORMAS DA REVISTA PEDIATRIC BLOOD AND CANCER – WILEY'S JOURNAL STYLE

AUTHOR GUIDELINES

WILEY'S JOURNAL STYLES

SUBMISSION AND CONTACT INFORMATION

Pediatric Blood & Cancer welcomes submitted manuscripts online at: <http://mc.manuscriptcentral.com/pbc>. Authors are encouraged to check for an existing account. If you are submitting for the first time, and you do not have an existing account, then create a new account. Once you have logged in, you will be presented with the Main Menu and a link to your Author Center. Enter your Author Center to submit your manuscript. At the end of a successful submission, a confirmation screen with manuscript number will appear and you will receive an e-mail confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact the Editorial Office.

Production Office

Jennifer Chinworth

pbcprod@wiley.com

Editorial Office

Michelle Bayman

PBCEditorialoffice@wiley.com

REQUIREMENTS

All manuscripts submitted to Pediatric Blood & Cancer must be submitted solely to this journal, may not have been published in any part or form in another publication of any type, professional or lay, and become upon publication the property of the publisher. Papers that have been previously published as meeting abstracts should include a footnote on the title page indicating the name of the presentation, meeting name and date, and publication site of the abstract. Any material reproduced or adapted from any other published or unpublished source must be duly acknowledged. It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce copyrighted material. Upon submission of a manuscript for publication, the author will be requested to sign an agreement transferring copyright to the publisher, who reserves copyright. Material published in this journal may not be reproduced or published elsewhere without the written permission of the publisher and the author. All statements in, or omissions from, published manuscripts are the responsibility of the author who will assist the editor and publisher by reviewing proofs.

No page charges will be levied against authors or their institutions for publication in this journal.

NOTE: Pediatric Blood & Cancer employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

AUTHORSHIP

All authors should have contributed in a significant manner and be in agreement with all content in a manuscript. The corresponding author will take responsibility for this requirement being met.

Individuals should only be listed as authors if they have participated in both the conception and design of the study and in the data analysis or editing. All authors must explicitly approve the final draft of the paper before it is submitted. Purely technical

contributions are not sufficient for authorship, but instead should be included in the acknowledgements. If the submission includes 10 or more authors, the cover letter should include justification for the extensive authorship list and reaffirm that all listed individuals meet the journal's authorship guidelines.

Statements of equal authorship contribution may be included. At least one person's name must precede a group-attributed authorship (e.g., "Tom Jones for the Meningitis Study Group").

Contributions by individuals who made direct contributions to the work but do not meet all criteria should be noted in the Acknowledgements section of the manuscript. Medical writers and industry employees can be contributors. Their roles, affiliations, and potential conflicts of interest should be included in the author list or noted in the Acknowledgments and/or Contributors section concurrent with their contribution to the work submitted. Signed statements from any medical writers or editors declaring that they have been given permission to be named as an author or as a contributor, or in the Acknowledgments section is also required. Failure to acknowledge these contributors can be considered inappropriate, which conflicts with the journal's editorial policy. For questions about authorship criteria, please consult the ICMJE guidelines and/or contact the Editorial Office prior to submitting.

ENGLISH LANGUAGE EDITING

Wiley suggests that authors from non-English speaking countries have their manuscript reviewed and corrected by a native English speaker or by Wiley's English Language Services(<http://wileyeditingservices.com/en/>) before submission.

Please note that while this service will greatly improve the readability of your paper, it does not guarantee acceptance of your paper by the journal.

DISCLOSURE STATEMENT. All authors must disclose in a statement following Acknowledgments under the title, "Conflict of Interest Statement," any affiliations that they consider to be relevant and important with any organization that to any author's knowledge has a direct interest, particularly a financial interest, in the subject matter

discussed. Such affiliations include, but are not limited to, employment by an industrial concern, ownership of stock, membership on a standing advisory council or committee, a seat on the board of directors, or being publicly associated with a company or its products. Other areas of real or perceived conflict of interest would include receiving honoraria or consulting fees or receiving grants or funds from such corporations or individuals representing such corporations. This requirement will apply to every sort of article submitted to the Journal, including original research, reviews, editorials, letters to the editor, and any others, and should be disclosed at the time of submission. The simplest remedy for conflict of interest is disclosure. It will not influence the editorial decision to accept or reject the manuscript. When an article is accepted for publication, the editors will discuss with the authors the manner in which such information is to be presented if additional questions arise.

ELOCATORS

This journal now uses eLocators. For more information, please visit the Author Services eLocator [page](#)here.

I. INSTRUCTIONS TO AUTHORS

COVER LETTER. The online submission program requires an author cover letter. Please note that the cover letter should:

- Be addressed to the journal's Editor-in-Chief;
- State what significant, new information the submission provides from that previously published in medical literature;
- Contain the manuscript title and all author names;
- Provide a brief summary of the findings and why they are important and appropriate for PBC;
- State what manuscript classification it fits, i.e., Research Article, Brief Report, etc;
- State that the manuscript has not been submitted elsewhere nor previously published;

- State any conflicts of interest;
- List names of 3 potential reviewers who: a) are experts in the field, b) are not from the authors' institutions, and c) have no other conflicts of interest;
- State who and why any colleagues should not be asked to review, if applicable;
- State that all authors have contributed to the manuscript in significant ways, have reviewed and agreed upon the manuscript content.

FILE ORDER. When uploading the files into the ScholarOne Manuscript Central system, please order the files as follows:

1. Text file -Word file (.doc) should be 8.5 x 11 inches with at least 1 inch margins on all sides
2. Table files - Each table should be uploaded in a separate Word file in numerical order
3. Figure files - Each figure should be uploaded as a separate TIF, EPS, PNG, or PDF file following in numerical order. Do not upload individual panels as separate files (e.g., "Figure 1a.tif" and "Figure 1b.tif").
4. Supporting Information files - Please note that Supporting Information files will be published in the exact format provided at submission. These files must be clearly identified as "Supporting Information" at the top of the first page.
5. For Revised and Resubmitted Manuscripts, Responses to Review Comments should be included in the "View and Respond to Decision Letter" field of the online submission system.

TITLE PAGE

- The complete title of the manuscript;

- The names of all authors (NOTE: While the number of authors should usually not exceed six, exceptions will be granted with adequate justification that can be included in the cover letter.)
- The complete affiliations of all authors;
- The name, address, phone, fax and email contact for the corresponding author;
- Word Count for:

a) Abstract (if applicable) and

b) Main Text (excludes title page, abstract, Conflicts of Interest, Acknowledgments, References, Tables, Figures, and Legends);

- The number of Tables, Figures, and Supporting Information files;
- A short running title (not to exceed 50 characters);
- Three to six keywords to index the content.
- An abbreviations key in a table. This should just be a two-column list, with the abbreviation on the left, and the full term or phrase on the right. ALL abbreviations used in the manuscript should appear in this table. (Though abbreviations that are only used in a Table can simply be defined with footnotes.)
- Papers that have been previously published as meeting abstracts should include a footnote on the title page indicating the name of the presentation, meeting name and date, and publication site of the abstract.

ABSTRACTS

- Abstracts should be included in the online submission form and in the manuscript file.
- Please do not include material in the Abstract that is not described in the main manuscript.
- See Article Types listing for specific formatting guidelines.

MAIN TEXT

- Double spaced with consecutive line numbering
- Font should 12pt in size, Times New Roman or Arial
- Order of elements: Title Page, Abstract, Introduction, Methods, Results, Discussion, Conflict of Interest statement, Acknowledgements, References, Legends
- ETHICS STATEMENT: If photographs include human subjects, the author must include an Ethics Statement in the main manuscript text, where appropriate. This statement should affirm that informed consent has been properly documented. When possible, any identifiers in the image (such as facial features or patient ID numbers) should be obscured prior to review.
- Use subheadings and paragraph titles whenever possible. Note, however, that the Discussion section should not have separate subsections. Subheadings should not be underlined or be followed by punctuation.
- Numbered or bulleted lists should be used in the manuscript text only when necessary. PBC prefers that lists be rewritten in paragraph form if possible.
- See Journal Style section for further PBC style preferences.

REFERENCES

AMA – American Medical Association

References: All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. Sample references follow:

Journal article:

1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Book:

2. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

For more information about AMA reference style, please see the New York Medical College Library's FAQs on a variety of reference types, or the official AMA Manual of Style.

- Authors are responsible for the accuracy of references.

The EndNote style file for PBC is no longer updated or supported (<http://authorservices.wiley.com/jendnotes/#p>).

- All references must be cited whether in text, figures or tables.
- Include the complete title of the article and inclusive page numbers.
- Articles accepted for publication and published on-line should be referenced like a journal article, except that the DOI (digital object identifier) and the date of prepublication should supplant the year, volume number, and page numbers. The cited article must be accessible to readers.
- Published abstracts may be cited in the references.
- Unpublished data and personal communications should not be listed as references.

TABLES

- Number tables consecutively with Arabic numerals.

- Do not include multi-part Tables (e.g., Table 1a, 1b, and 1c).
- The table number and title should be placed above the table.
- Correct Example: TABLE 1 Graph demonstrating results
- Incorrect Example: Table 1: Graph Demonstrating Results
- Abbreviations should be in footnotes beneath the table. Abbreviations should be in paragraph form and footnotes should be a vertical list.
- Any bold font in the table needs to be defined with a footnote.
- Tables should not be overly long (2 pages max), ideally in landscape format.

FIGURES

- There is no charge to authors for color figures. Please use color for emphasis and clarity, but avoid use of unnecessary and background colors or shading.
- Figures should be numbered using Arabic numerals, i.e., Figure 1, Figure 2, etc., and cited in the manuscript as (Fig. 1), (Figs. 3A and 3B), etc. Do not include a label ("Figure X") in the image itself.
- The figure number and legend should be included in BOTH:

a) The legend list at the end of the manuscript AND

b) The Description field of the online submission form for that file.

- Figures and text within a figure should not be surrounded by boxed lines. Crop extra white space from around images. Do not include legend text in the figure files.
- Label each panel with a capital letter in the upper left corner
- Panels should be labeled as A and B (not A. or A- or A)).
- Presentation of growth charts may be facilitated by utilizing tools such as those listed below:

a) <http://www.seattlechildrens.org/about/community-benefit/obesity-program/excel-based-clinical-tools-assist-growth-charts/>

b) <http://www.who.int/childgrowth/software/en/>

c) <https://itunes.apple.com/us/app/pediatric-growth-charts-by/id617601789?mt=8>

- Upload figures as individual TIF, EPS, or PNG files. High resolution PDF files may also be uploaded.
- Upload composite figures (with multiple panels) as one file. Do not upload separate panel files for a single figure.
- The journal requires a minimum resolution of 300dpi for all figures.

- 1200 DPI/PPI for black and white images, such as line drawings or graphs

- 300 DPI/PPI for picture-only photographs

- 600 DPI/PPI for photographs containing pictures and line elements, i.e., text labels, thin lines, arrows

- Figures must be legible at 100% zoom in the file itself. We recommend that all text in figures be at least 6pt.
- Arrows should be included in radiographs or histology figures to point out areas of interest described in the figure legends below the figures.
- Please ensure that all axes are labeled clearly and in accordance with the journal's requirements for numbering. Place zeroes before decimals. Separate digits with a space, not a comma, to indicate place values beyond thousands. For example: 5034 but 12 345.
- Any axis in a given figure must have a centered label. Note that numbers on the y-axis should be oriented to read left to right. For example:

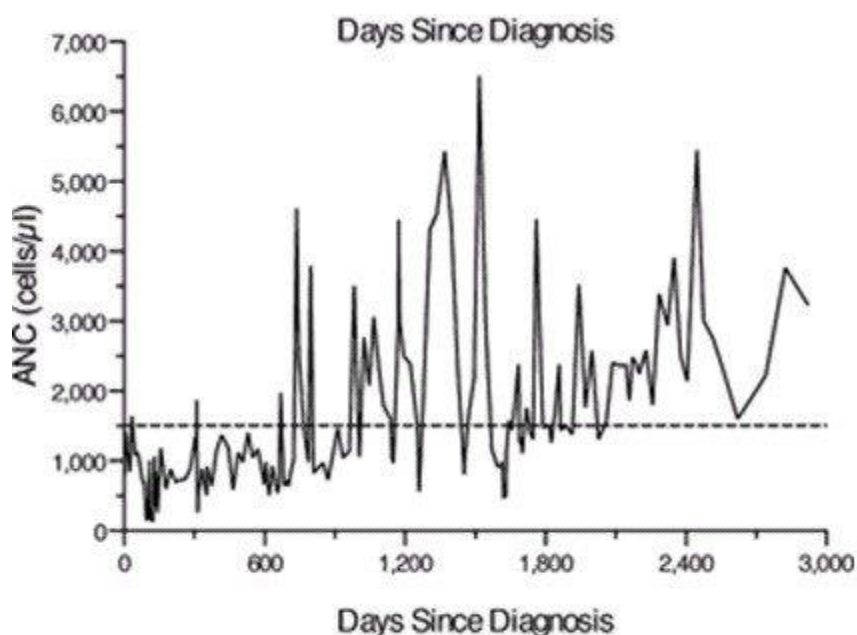


FIGURE 1 Platelet count and absolute neutrophil count (ANC) versus time since diagnosis. Treatment courses are indicated at top with doses as described in Table 1: Vbl, vinblastine; Pred, prednisone; Ritux, rituximab; MP, mercaptopurine. IVIg = short course intravenous immunoglobulin 1 g/kg/day for 2 days, given for immune thrombocytopenia.

Image from: Cooper, S. L., Arceci, R. J., Gamper, C. J., Teachey, D. T. and Schafer, E. S. (2015), Successful Treatment of Recurrent Autoimmune Cytopenias in the Context of Sinus Histiocytosis With Massive Lymphadenopathy Using Sirolimus. *Pediatr. Blood Cancer*. doi: 10.1002/pbc.25770

SUPPORTING INFORMATION MATERIAL

--Supporting Information will be published as submitted and will not be corrected or checked for scientific content, typographical errors or functionality. The responsibility for scientific accuracy and file functionality remains entirely with the authors. A disclaimer will be displayed to this effect with any Supporting Information published.

- Supporting Information should always be provided in its final format, as it will not be copyedited or changed from its original format. It will not be available for review prior to publication.
- Upload these files as either “Supporting Information for Review” or “Supporting Information NOT for Review,” as appropriate.
- For each individually uploaded Supporting Information file, a corresponding legend must be included in the manuscript file.
- Supporting tables or figures may be cited within the text (as Supporting Information Table S1 and Supporting Information Figure S1) and will be made available to readers online.
- Tables should be limited to 1-2 pages in a Word file, preferably in portrait orientation. Overly long tables should likely be reformatted as Supporting Information material. In this case, uploading Excel files is suitable.

SPECIFIC JOURNAL STYLE GUIDELINES

- Either American or British style is acceptable. American: use Merriam-Webster's; British: Oxford Shorter Dictionary.
- The statement ‘data not shown’ is not allowed within the manuscript text as readers cannot evaluate if the data are not shown. Such information should either be included in the manuscript or provided as a Supporting Information for Review file.
- Please do not use slang expressions, such as “On the other hand”.
- Avoid statements such as “This is the first study...” and “To our knowledge...” and “this is the largest.” These expressions are not meaningful.

>>Name Formatting

- Disease names should be written without apostrophes, as follows: Wilms tumor, Burkitt lymphoma, Hodgkin disease, Ewing sarcoma.

- Abbreviations should be defined on first usage, then using of abbreviation alone is acceptable: e.g., Wilms Tumor (WT), then referred to as WT in subsequent mention, without quotation marks.
- Abbreviations should follow the guidelines in the CBE Style Manual, 5th Edition (available from the Council of Biology Editors, Inc., One Illinois Center, Suite 200, 111 East Wacker Drive, Chicago, IL60601-4298).
- Gene and protein designations should be written in the international style approved by the HUGO Gene Nomenclature Committee at <http://www.genenames.org/guidelines.html>
- Use uncapitalized generic names (e.g., cyclophosphamide) for all drugs and pharmaceutical preparations.
- Trade names (capitalized) for appliances, etc., may be used in the Methods section, and the manufacturers identified by name.
- Use of 'girl' and 'boy' should instead be 'male' and 'female'.

>>Human Subjects

- Please do not refer to patients by their diseases, e.g. “Wilms tumor patients” or “ALL patients.” Instead, identify them as “patients with Wilms tumor” and “patients with ALL.”
- Patients should be referred to only by subject numbers and not with names, initials, or other potentially identifying characters.
- Manuscripts reporting the results of experimental investigations on human subjects must include a statement to the effect that procedures had received official institutional approval.
- There should be no dates in the text or on radiographs as these are potential patient identifiers.

>>Numbers

- All measurements must be in metric units.
- Decimal numbers should have a zero preceding the decimal point (e.g., 0.95g).

- Decimal points should be periods and not commas.
- Do not begin sentences with a number. For example, it should be “Three patients...” instead of “3 patients...”
- Separate digits with a space, not a comma, to indicate place values beyond thousands. For example: 5034 but 12 345.
- P values should not be zero but refer to a number (e.g., $p < 0.0001$ not $p = 0.0000$).

II. ARTICLE TYPES

Submission Type	Description	Abstract	Word count**	References	Maximum # of Primary Figures and Tables** * (Combined)
Research Articles	Articles should represent original and in-depth studies involving any aspect of clinical or laboratory investigation. Please note that systematic reviews and meta-analyses should be pre-approved and submitted as Reviews.	250 words Structured*	3,500 words	as needed	6

Brief Reports	Brief reports may include descriptions of single or several patients that demonstrate novel findings or add in a significant way to current knowledge. Brief reports may also include novel laboratory observations relating to clinical questions or advances in laboratory methodologies. Brief reports should include the following sections: Introduction, Results (including Methods or Case Descriptions), and Discussion. The Methods may either be presented in a separate section or incorporated into the results, depending on length and complexity.	100 words Unstructured	1,200 words	as needed	2
Critical Reviews	Reviews of important and timely subjects can be invited through the Editorial Board or submitted after a brief introduction to the Editor-in-Chief. Authors should consult the editor prior to submission by emailing PBCEditorialoffice@wiley.com . The inquiry should include the authors' names and affiliations, subject matter of the review, and rationale for publication in PB&C. Reviews should focus on the critical aspects of a subject, linking what is known to what areas	150 words Unstructured	3,500 words	as needed	6 Illustrations and tables should be used only to provide summaries or a synthesis of ideas and/or

	remain controversial or unanswered. Systematic reviews and meta-analyses must adhere to the guidelines provided by the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses report (PRISMA Statement). Historical accounts of important events relating to pediatric hematology/oncology are also acceptable. Requests for permission to submit manuscripts of greater length should be emailed to the Editor-in-Chief prior to submission.				data not included in the text.
How I Approach	These articles may be submitted only at the invitation of the Editors. These articles, written by authorities in the field, address approaches to diagnosis or treatment of pediatric blood disorders or cancers that lack sufficient high-quality data for a Clinical Practice Guideline and do not have available consensus statements. The articles should incorporate the latest scientific and clinical basis for clinically relevant recommendations by an experienced and respected expert	100 words Unstructured	3,500 words	as needed	6 Illustrations and tables should be used only to provide summaries or a synthesis of ideas and/or data not included

	on the disease process, with one or two co-authors if necessary.				in the text.
Reviews of books and other media formats	Reviews of books, films or other media formats relevant to the scientific or clinical practice of medicine with particular importance to pediatric hematology/oncology can be invited or submitted independently. In the latter case, consultation with the Editor-in-Chief should be made prior to submission.	N/A	1,000 words	as needed	Include only if they highlight or clarify points made in the text.
Highlights	Highlights are submitted only at the invitation of the Editors. These will summarize findings from one or more recently accepted papers and put them into perspective in terms of past work and future challenges. Controversial areas should be included.	N/A	1,000 words	as needed	A single original figure or table that summarizes the content or text of the paper(s) is encouraged but not required.

Commentaries	Commentaries are usually invited but may be submitted independently after consultation with the Editor-in-Chief. Commentaries should focus on a controversial subject or a timely topic of relevance to the journal's readership. Commentaries will be reviewed and may require changes or be rejected.	N/A	1,200 words	as needed	Include only if they highlight or clarify points made in the text.
Correspondence and Letters	Letters to the Editor should usually be in reference to previously published manuscripts in Pediatric Blood and Cancer. Correspondence relating to important and timely publications or topics from other sources and brief descriptions of interesting laboratory or clinical observations may also be appropriate.	N/A	500 words	as needed	1 Illustrations or tables should only be included when absolutely necessary.
Historical Perspectives	A Historical Perspective should be submitted only after consultation with the journal's Editor-in-Chief. This occasionally-appearing series focuses on the history of pediatric hematology/oncology.	100 words Unstructured	1,500 words	as needed	2

On Children, Blood, and Cancer	These narratives, topical essays, historical vignettes, poems, and photographic essays will provide personal, artistic interpretations of the experiences of children with cancer or blood disease, or of caring for these children. Submissions may describe difficult, challenging, informative, or uplifting patient encounters or clinical experiences, or may explore other aspects of professional life in pediatric hematology/oncology. Like all work submitted to PBC, submissions should be original, and not previously published or under consideration elsewhere. Poems should be fewer than 50 lines and 400 words.	N/A	1,200 words	as needed	Include only if they highlight or clarify points made in the text. Photo essays may include up to 6 images.
Special Reports	To be submitted only after consultation with the journal's Editor-in-Chief, the report should focus on a subject of current interest to readers and/or importance to the sponsoring societies.	100 words Unstructured	2,500 words	as needed	2
Clinical Practice	CPGs should concern important and timely subjects. In 2011, the Institute of Medicine updated its definition of a CPG to reflect	100 words	4,500	as needed	Illustrations, tables, and tools

Guidelines	essential components of evidence-based guidelines: “CPGs are statements that include recommendations intended to optimize patient care that are informed by a systematic review of evidence and an assessment of the benefits and harms of alternative care options.” CPG submissions must receive pre-submission approval from the Editor-in-Chief. CPGs must meet the Institute of Medicine standards for trustworthiness as operationalized by the criteria for inclusion in the National Guideline Clearinghouse (http://www.guideline.gov/about/inclusion-criteria.aspx). Criteria include, but are not limited to, recommendations being based upon a systematic review (the search strategy should be included as an Appendix) and the creation of evidence tables. Use of an approach for recommendation development such as Grades of Recommendation, Assessment, Development, and Evaluation (GRADE) is encouraged. An excellent resource for preparing a CPG can be found at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3928232/ . Guideline	Unstructured	words		for implementation such as clinical care algorithms are encouraged to augment the text.
------------	---	--------------	-------	--	---

	developers are encouraged to evaluate their own CPG using the Appraisal of Guidelines for Research & Evaluation II tool (http://www.agreetrust.org/agree-ii/).				
Meeting Reports and Supplements	Concise summaries of meetings that have important information to convey to the readers of Pediatric Blood & Cancer are welcomed but consultation with the Editor-in-Chief should occur before submission. Summaries should emphasize the issues discussed at the meeting along with why they are important or controversial. Authors must confirm permission from presenters to include any novel information. More extensive meeting reports with manuscripts from the speakers at the meeting are also welcomed but early consultation with the Editor-in-Chief must take place in order to determine the type and number of manuscripts, expected pages to be published, and the review process, as well as procurement of additional funding if required.	100 words Unstructured	1,500 words	as needed	Include only if they highlight or clarify points made in the text.

* Structured headings: (Background, Procedure, Results, and Conclusions)

** Word count excludes title page, Abstract, References, Tables, Figures, and Legends

*** Tables and figures should not simply repeat information in the text. Additional figures and tables can be included as Supporting Information.

MEETING ABSTRACTS

- Abstract text should be 300 words or less. That word count excludes the abstract title, author names and affiliations.
- There should be 4 sections to the abstract: Background/Objectives, Design/Methods, Results, Conclusion. All text should be included in a single paragraph and contain no lists.
- Abstract text should be written in complete sentences and in correct English.
- There should be a period at the end of all sentences.
- Tables and figures (if allowed in the submitting society's instructions), only when critical to the content, may be included and must comply with PBC Author Guideline format.
- Abstract titles should be in all capital letters, e.g., INDUCTION OUTCOMES IN CHILDREN WITH ALL
- Author names should be listed below the abstract title. The first and last names of authors should be written in upper and lower case letters and should be boldface. No degrees of authors should be included.
- Author affiliations should be written in upper and lower case letters, e.g., Tata Memorial Centre
- Geographic location should be indicated by city and country, with state, province, or other subdivision added if necessary for disambiguation, e.g. London, UK; but Portland, OR, USA. Names of cities and countries with 2 words should be written in upper and lower case letters, e.g., Czech Republic, South Africa, Los Angeles, St. Louis. Common abbreviations may be used, e.g. UK, USA.
- *Periods should be used in numbers for decimal points, not commas, e.g., $P=0.015$, and numbers beginning with a decimal point should be preceded by a zero.

- Disease names should be written without apostrophes, e.g., Hodgkin lymphoma, Non-Hodgkin lymphoma, Burkitt lymphoma, Ewing sarcoma
- Separate digits with a space, not a comma, to indicate place values beyond thousands. For example: 5034 but 12 345.
- Abbreviations should be defined on first usage, then using of abbreviation alone is acceptable: e.g., Wilms Tumor (WT), then referred to as WT in subsequent mention, no quotation marks, however.
- Abstracts need to be proofread for all spelling and grammatical errors.
- Abstracts that do not satisfy publication instructions will not be published.

CLINICAL TRIALS

- NOTE: Clinical trials can be submitted as either a Research Article or a Brief Report. There is not a separate article type for clinical trials.
- Reporting prospectively conducted trials is strongly encouraged and such trials will be prioritized
- Retrospective reporting of clinical data is potentially acceptable for publication. All such manuscripts need to comply with documentation of approval by an institutional ethical review board or equivalent. Retrospective therapeutic studies should be avoided, as they may circumvent necessary informed consent, safety, and monitoring standards.
- All manuscripts reporting clinical trials need to document that the trial or study was approved Institutional Review Board or equivalent.
- All manuscripts reporting clinical trials need to be registered with 'ClinicalTrials.Gov' and/or an equivalent site.
- Manuscripts must include NCT numbers in the abstract.

DATA SHARING AND DATA ACCESSIBILITY

Please review Wiley's policy [here](#). This journal expects data sharing.

Expects Data Sharing

Pediatric Blood and Cancer recognizes the many benefits of archiving research data. Pediatric Blood and Cancer expects you to archive all the data from which your published results are derived in a public repository. The repository that you choose should offer you guaranteed preservation (see the registry of research data repositories at <https://www.re3data.org/>) and should help you make it findable, accessible, interoperable, and re-useable, according to FAIR Data Principles (<https://www.force11.org/group/fairgroup/fairprinciples>).

All accepted manuscripts are required to publish a data availability statement to confirm the presence or absence of shared data. If you have shared data, this statement will describe how the data can be accessed, and include a persistent identifier (e.g., a DOI for the data, or an accession number) from the repository where you shared the data. Authors will be required to confirm adherence to the policy. If you cannot share the data described in your manuscript, for example for legal or ethical reasons, or do not intend to share the data then you must provide the appropriate data availability statement. Pediatric Blood and Cancer notes that FAIR data sharing allows for access to shared data under restrictions (e.g., to protect confidential or proprietary information) but notes that the FAIR principles encourage you to share data in ways that are as open as possible (but that can be as closed as necessary).

Sample statements are available here. If published, all statements will be placed in the heading of your manuscript.

NIH	Public	Access	Mandate
For those interested in the Wiley-Blackwell policy on the NIH Public Access Mandate, please visit our policy statement			

Wiley Author Licensing Services (WALS)

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement
 If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen
 If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License	OAA
Creative Commons Attribution Non-Commercial License	OAA
Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License	OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

For additional tools visit Author Resources - an enhanced suite of online tools for Wiley Online Library journal authors, featuring Article Tracking, E-mail Publication Alerts and Customized Research Tools.