



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

THIAGO PILOTO DE ANDRADE

PERFIL DE LINFÓCITOS T E CÉLULAS NK EM PACIENTES COM
ANEMIA FALCIFORME

ARACAJU

2017

THIAGO PILOTO DE ANDRADE

**PERFIL DE LINFÓCITOS T E CÉLULAS NK EM PACIENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

Monografia apresentada ao Departamento de Medicina
como requisito parcial para obtenção de título de
graduado em Medicina pela Universidade Federal de
Sergipe.

Orientadora: Prof. Dra. Rosana Cipolotti

ARACAJU

2017

THIAGO PILOTO DE ANDRADE

**PERFIL DE LINFÓCITOS T E CÉLULAS NK EM PACIENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

Monografia apresentada ao Departamento de Medicina
como requisito parcial para obtenção de título de
graduado em Medicina pela Universidade Federal de
Sergipe.

Thiago Piloto de Andrade
Graduando

Prof. Dr. Rosana Cipolotti
Orientadora

Aprovada em: ___/___/___

Prof. Osvaldo Alves de Menezes Neto

AGRADECIMENTOS

Gratidão é algo fundamental em nossas relações. Em uma conquista alcançada, uma bênção recebida, no ganho de um simples favor, gratidão faz parte. É a expressão fruto de alguém que se sente satisfeito por um ato realizado por outro alguém que, muitas vezes, não espera nada em troca, a não ser um “Obrigado! ”.

Agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui. Em cada etapa me permitiu adquirir novas forças para enfrentar desafios maiores. Sem a fé em sua presença e cuidado tudo poderia ser mais difícil.

À minha família, pelo apoio incondicional, por acreditar em mim. Seu apoio foi fundamental para trazer leveza às dificuldades da trajetória.

À professora Rosana Cipolotti, pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação, sobretudo por ser tão inspiradora, solícita e dedicada aos seus alunos.

Sou grato a Dra. Priscila Percout, pela parceria e pelo enorme apoio em todo o processo de trabalho, se mostrando presente e solícita em cada passo. Seus direcionamentos foram fundamentais nos desafios de um trabalho com um tema tão específico.

A todos os integrantes do laboratório do HU que proporcionaram a realização dos experimentos, sem os quais o trabalho não seria viável, os professores Roque, Amelia, Cristiane e Tatiana, e a doutoranda Aline.

Àqueles e àquelas que de forma direta ou indireta colaboraram para a execução deste trabalho. Obrigado!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê. ”

Arthur Schopenhauer

“ Sonhos determinam o que você quer. Ação determina o que você conquista. ”

Aldo Novak

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Bases fundamentais do curso clínico da anemia falciforme	15
--	-----------

ARTIGO CIENTÍFICO

Figura 1 - Percentual de subtipos de linfócitos T em paciente portador de anemia falciforme, em indivíduo portador de traço falciforme e controle	45
Figura 2 - Histograma da análise dos subtipos de linfócitos	46
Figura 3 - Histograma da análise dos subtipos de células NK	47

LISTA DE ABREVIATURAS

A2aR	Receptor A2a de adenosina
AF	Anemia Falciforme
DAMP	Padrões moleculares associados ao dano
DF	Doença Falciforme
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina-1
FNTα	Fator de necrose tumoral α
FT	Fator Tecidual
HbA	Hemoglobina A
HbAS	Traço falciforme
HbF	Hemoglobina F
HbS	Hemoglobina S
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IR	Isquemia-Reperfusão
MHC	Moléculas do Complexo de Histocompatibilidade
NFκB	Fator de transcrição nuclear fator κ B
NK	Assassinas naturais
NKT	Células T assassinas naturais
NO	Óxido nítrico
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
TCR	Receptor de células T
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1

SUMÁRIO

I. Revisão de literatura	8
1. Introdução	9
2. Sistema Imune - Uma visão geral	11
3. Fisiopatologia da Anemia Falciforme: Vasoclusão x Hemólise	14
4. Hemólise e Inflamação Estétil	16
5. Vasoclusão, Hemólise, Lesão endotelial e Adesão Celular	18
5.1 Vasoclusão, Hemólise e o Endotélio	18
5.2 Vasoclusão, Hemólise e o Eritrócito	20
5.3 Vasoclusão, Hemólise e Leucócitos	20
5.4 Vasoclusão, Hemólise e Coagulação	21
5.5 Vasoclusão, Hemólise, Óxido Nítrico e Estresse Oxidativo	22
5.6 Vasoclusão, Hemólise, Linfócitos T e Células NK	23
6. Referências Bibliográficas	26
II. Normas para Publicação	31
1. Preparation of the Manuscript	32
1.1 General Information	32
1.2 Technical Requirements	33
1.3 Examples of References - Printed Documents	35
1.4 Electronic Documents	35
2.2 Submission	36
III. Artigo Científico	37
Resumo	40
Abstract	41
Introdução	42
Material e Métodos	44
Resultados	45
Discussão	48
Conclusão	50
Referências Bibliográficas	51
IV. Anexo	52

I. REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

Entre as doenças hematológicas, a anemia falciforme (AF) integra um subgrupo de hemoglobinopatias que têm em comum a predominância da hemoglobina S (HbS), denominado doença falciforme, e representa a forma mais grave destas. É uma doença hereditária e uma das patologias monogênicas mais comuns do mundo. Embora os pacientes compartilhem da mesma mutação genética, a evolução clínica é consideravelmente variável. (MCGANN, 2014; MEIER & MILLER, 2012).

Para o desenvolvimento da AF, é necessário a herança homocigótica da HbS. Quando herdada em heterocigose, o indivíduo pode apenas apresentar o traço falciforme (HbAS), ou ser passível de adquirir outras hemoglobinopatias da doença falciforme, devido ao risco de co-hereditariedade da HbS com outras mutações. Estas podem ser de aspecto qualitativo como a hemoglobinopatia SC e SD e quantitativo como a junção HbS/ β -talassemia (β^0 ou β^+) (MEIER & MILLER, 2012).

A gravidade clínica das diversas formas de síndrome falciforme, entre outros fatores, é diretamente proporcional às concentrações de HbS e sua relação com as outras hemoglobinas contidas no eritrócito. Indivíduos com traço falciforme apresentam geralmente 40% de HbS e 56%-58% de Hemoglobina A (HbA), sendo tipicamente assintomáticos. Indivíduos com S/ β^0 -talassemia não apresentam HbA e tem evolução clínica semelhante a homocigotos SS, sendo mais graves quando comparados aos que portadores de S/ β^+ -talassemia, quando há ainda certa quantidade de HbA. Uma exceção à essa afirmativa é a junção HbS-persistência da hemoglobina fetal (S/PHHF), que mesmo apresentando concentração intracelular de HbS elevada comparada à hemoglobina fetal (HbF) (70% e 30% respectivamente), não integra o grupo doença falciforme, pois são clinicamente assintomáticos. (FORGET & BUNN, 2013; MEIER & MILLER, 2012).

A AF é a doença hereditária mais prevalente no Brasil, chegando a acometer 0,1% a 0,3% da população negroide, com tendência a atingir parcela cada vez mais significativa da população (WATANABE, 2007; DI NUZZO & FONSECA, 2004). Já a frequência do traço falciforme varia de 2% a 8% (MURAO & FERRAZ, 2007).

A distribuição do gene S no Brasil é bastante heterogênea, dependendo da composição de afrodescendentes na população local. Assim, há uma maior prevalência de heterocigotos para HbS nas regiões norte e nordeste (CANÇADO & JESUS, 2007). Já em Aracaju, a análise

de 1345 doadores de sangue obteve o resultado de 4,1% para portadores de HbS (VIVAS *et al*, 2006).

A presença da HbS gera uma hemácia rígida e em forma de foice que tem sua flexibilidade reduzida, o que dificulta sua passagem através da microcirculação. A diminuição da viscosidade sanguínea associada a flexibilidade reduzida dos eritrócitos leva à formação de microtrombos, causando obstrução vascular, responsável por crises álgicas agudas e lesões teciduais progressivas, comuns aos portadores de AF (SERJEANT, 1997; REES *et al*, 2010).

A causa mais frequente de hospitalização desses pacientes é a crise álgica, associada à isquemia tecidual aguda causada pela vasclusão, responsável por dor excrucitante, necessitando frequentemente de internação e analgesia com opióides. Desidratação, mudanças de temperatura, estresse, acidose e infecção funcionam como fatores desencadeantes dessas crises (SCHNOG *et al*, 2004; VICHINSKY *et al*, 2005).

Crises repetidas estariam correlacionadas à diminuição da sobrevida por provocar lesões de órgãos-alvo e disfunções orgânicas múltiplas. Priapismo, síndrome torácica aguda, acidente vascular encefálico, sequestro hepático ou esplênico, dactilite, necrose asséptica do quadril, hipertensão pulmonar, hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo e entre outros são alguns dos exemplos de lesão orgânica aguda e crônica que podem estar presentes nos portadores de AF. (MARTINS *et al*, 1998; BANDEIRA *et al*, 1999; LOUREIRO *et al*, 2005; ALMEIDA *et al*, 2008).

Logo a visão clássica da AF como um doença genética que apresenta uma mutação primária, que leva a polimerização da HbS e formação de um eritrócito em foice que promove a obstrução do fluxo sanguíneo causando sofrimento aos tecidos, de forma aguda e cronicamente, é muito simplória para uma doença com espectro de lesões sistêmicas enorme.

Uma visão mais complexa da fisiopatologia é necessária para entendimento da AF. Um modelo baseado em vasclusão associado a uma resposta inflamatória crônica parece mais apropriado para justificar a AF. A formação de um eritrócito em foice, seguida por obstrução do fluxo sanguíneo, desencadeia lesão de isquemia-reperfusão (IR) promovendo alteração na estrutura de sua membrana que gera um dano endotelial que serve de gatilho para uma resposta inflamatória associada a expressão de moléculas de adesão e liberação de interleucinas, promovendo a adesão de leucócitos, plaquetas e obstrução de microcirculação que gera novamente mais lesão de IR. (PLATT, 2000).

A Lesão de IR desencadeia uma cascata inflamatória que é iniciada pela ativação de células T e NK. Em modelo animal já foi observado que a lesão de IR da anemia falciforme

promove elevação de interleucinas associadas a atividade de células NK , no baço, fígado e pulmão de camundongos (WALLACE *et al*, 2009).

Assim, o conhecimento da participação de cada linhagem de linfócitos T e NK que estão envolvidos no complexo processo de vasclusão pode contribuir para o entendimento da sua fisiopatologia, e, a partir daí, para a definição de estratificadores de risco relacionado a complicações, além de futuras estratégias terapêuticas.

2. SISTEMA IMUNE - UMA VISÃO GERAL

O sistema imune simploriamente pode ser dividido em duas respostas imunológicas conhecidas como resposta imune inata e resposta imune adquirida. A resposta imune inata ocorre muitas vezes frente a primeira resposta a presença de agente infeccioso enquanto que a resposta adquirida (ou adaptativa) é uma resposta específica e se deve a exposição repetida a uma determinada infecção. A resposta inata usa células fagocíticas (neutrófilos, monócitos e macrófagos), células que libertam mediadores inflamatórios (basófilos, mastócitos e eosinófilos) e células assassinas naturais (NK). O método molecular presente desta resposta incluem o sistema complemento, proteínas de fase aguda e citocinas. A resposta adquirida envolve a proliferação de células B e T, o que ocorre quando os receptores de superfície destas células se ligam ao antígeno (MACKAY & ROSEN, 2000).

O corpo pode potencialmente responder a quase qualquer coisa, e este reconhecimento imune se dá a partir da ligação de moléculas a receptores do sistema imune inato ou adquirido. Moléculas reconhecidas por receptores em linfócitos são genericamente conhecidas como antígenos e podem variar desde pequenas a moléculas altamente complexas. Tanto o receptor de células T (TCR) como o receptor das células B, têm locais de ligação que são apenas 600 a 1700 Å². Portanto, estes receptores reconhecem apenas uma pequena parte de um antígeno complexo, referido como antígeno epítipo (GARCIA *et al*, 1999).

O sistema imune inato consiste em todos os sistemas de defesas que carecem de memória imunológica. Os macrófagos, são células do sistema imune inato, capazes de discriminar moléculas entre "estrangeiras" e "próprias" e que tem capacidade de fagocitose. Tanto macrófagos como neutrófilos têm receptores para anticorpos e componentes do complemento, de modo que o revestimento de microorganismos com anticorpos ou componentes do complemento ou ambos melhoram a fagocitose. As células oriundas de tecido necrótico também expressam moléculas na sua superfície celular, que são identificadas pelo macrófago tornando-as candidatas à fagocitose (ADEREM, 1999).

Outro componente celular chave da imunidade são as células dendríticas, estas células ao serem ativadas se comportam como células apresentadoras de antígenos. Na sua ativação, as células dendríticas passam a expressar moléculas co-estimuladoras, conhecidas como CD80 e CD86. Na sua superfície, estas moléculas fornecem sinais necessários para ativação de linfócitos além daqueles fornecido através do receptor de antígeno. As células dendríticas migram pela drenagem local até o linfonodo, onde estas apresentam antígenos às células T. O antígeno é processado intracelularmente em peptídeos curtos por clivagem proteolítica antes de ser apresentada pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Existem duas classes de MHC, classe I e Classe II. As moléculas de classe II apresentam os peptídeos ao receptor celular na superfície das células T auxiliares (MACKAY & ROSEN, 2000).

As células NK participam do sistema imune na proteção contra células infectadas e células malignas. Eles reconhecem seus alvos de duas maneiras, e como muitas outras células, possuem receptores que se ligam a fração Fc da Imunoglobulina G (IgG). Estes receptores ligam as células NK à células-alvo por um processo chamado de resposta celular citotóxica dependente de anticorpo. O segundo sistema de reconhecimento que é característico das células NK depende de receptores inibidores de morte. Os receptores ativadores da célula NK reconhecem uma série de moléculas diferentes presentes na superfície de todas as células nucleadas, são estas MHCs classe I, estas moléculas funcionam normalmente como um sinal inibidor para células NK. Porém estas moléculas podem perder essa habilidade, como resultado de interferência microbiana ou por transformação maligna. Esta falta de moléculas de MHC de classe I significa que não há sinal inibitório e a célula NK mata a célula alvo anormal através da inserção do sistema de formação de poros através da molécula de perforina na membrana alvo e depois injeta moléculas citotóxicas conhecidas como granzinas (SCHUSTER *et al*, 2016).

A resposta inata frequentemente envolve a participação de substâncias do sistema complemento, proteínas de fase aguda e citocinas. O primeiro acontecimento da ativação do complemento, que se baseia numa cascata de amplificação comparável à cascata de coagulação, é a geração de uma série de substâncias imunologicamente ativas. Este sistema, que consiste em três vias independentes, mas que interagem entre si, constitui um poderoso braço de imunidade inata, e sua principal função é reconhecer e destruir microrganismos patogênicos, bem como eliminar auto-antígenos. Por exemplo, a ativação do complemento gera C3b, que reveste toda a superfície do patógeno, o C5a atrai os neutrófilos, o C3a e o C4a

desencadeiam liberação de histamina pela degranulação de mastócitos (GHEBREHIWET, 2016).

Substâncias liberadas pelo patógeno e pelos tecidos danificados estimulam a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, alertando as células sobre a presença de infecção ou da lesão. A molécula L-selectina expressa pelo endotélio reconhece hidratos de carbono, estruturas presentes nos neutrófilos e promovem a adesão vascular. Os neutrófilos que rolam ao longo da parede do vaso são presos em seu curso por essas interações. À medida que o neutrófilo se torna ativado, a L-selectina da sua superfície é substituída por outras moléculas de adesão, tais como as integrinas. Estas integrinas ligam a molécula E-selectina, que aparece na parede dos vasos sanguíneos sob a influência de mediadores inflamatórios tais como lipopolissacarídeo, interleucina-1(IL-1) e fator de necrose tumoral α (FNT- α) (MACKAY & ROSEN, 2000).

O sistema imune adaptativo depende da interação e da expansão clonal dos linfócitos. O desenvolvimento de linfócitos e das células da linhagem mielóide, a partir de células-tronco, no fígado fetal e na medula óssea, é guiado por interações com células estromais (tais como fibroblastos) e por citocinas (fatores estimuladores de colônias). As fases iniciais do desenvolvimento linfocitário não requerem a presença de um antígeno, mas uma vez após a maturação destas células, sua sobrevivência e diferenciação depende da presença do antígeno (MESQUITA JÚNIOR, 2010).

A estrutura do receptor dos linfócitos B é capaz de se acoplar aos anticorpos, proteínas que são constituídas de duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas que são mantidas juntas por ligações de dissulfeto. As cadeias pesadas especificam cinco classes de imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE) e as cadeias leves especificam em κ e λ (MESQUITA JÚNIOR, 2010).

Nos linfócitos T, o receptor de antígeno é uma molécula transmembrana que consiste em heterodímeros conhecidos como alfa e beta ($\alpha\beta$) ou gama e delta ($\gamma\delta$). O desenvolvimento dos linfócitos T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ seguem estágios sequenciais, consistindo na recombinação somática e expressão dos genes do TCR, proliferação celular, seleção induzida pelo antígeno e aquisição de fenótipos de capacidade funcional. A maioria dos timócitos imaturos (linfócito T presentes no timo) não expressam o TCR ou os correceptores CD4 e CD8 e migram através do córtex, onde os eventos de maturação ocorrem quando expressam pela primeira vez o TCR e iniciam a maturação em células CD4 ou CD8 (LIMA & CARNEIRO-SAMPAIO, 2007).

Não há mais de alguns milhares de linfócitos específicos para cada antígeno. Uma vez que cada célula B é programada para expressar apenas um dos muitos potenciais anticorpos, todas as moléculas de antígenos ligadas a um receptor em um dado linfócito têm a mesma especificidade. Logo após a ligação do antígeno com o receptor, os linfócitos são selecionados para participarem de uma resposta imune, um processo conhecido como seleção clonal. As células selecionadas com antígeno proliferam, conduzindo a um rápido aumento do número de linfócitos B ou T que podem reconhecer o antígeno. A maioria das respostas envolvem muitos clones diferentes - estas respostas são conhecidas como policlonais (MACKAY & ROSEN, 2000).

Em resposta imune normal a patógenos, os linfócitos T *naive*, a partir da apresentação de antígenos, tornam-se células efetoras: linfócitos T auxiliares (CD4 positivo) e T citotóxico (CD8 positivo). Os linfócitos T atuarão na resposta imune adaptativa regulando-a através de produção de citocinas, promovendo dois tipos de resposta imune (TH1 e TH2). As moléculas CD4 e CD8 são proteínas das células T que se ligam as regiões não polimórficas das moléculas do complexo de moléculas MHC e traduzem os sinais que, juntamente com os sinais liberados pelo complexo TCR, iniciam a ativação das células T. Normalmente, as células T $\alpha\beta$ maduras expressam CD4 ou CD8, embora existam referências da expressão de ambos os marcadores. Esses correceptores interagem com as moléculas de MHC, quando o TCR reconhece de forma específica o complexo peptídeo-MHC na célula apresentadora de antígeno. Cerca de 65% das células T $\alpha\beta$ maduras do sangue e dos tecidos expressam o correceptor CD4 e 35% do CD8. ((LIMA & CARNEIRO-SAMPAIO, 2007; MESQUITA JÚNIOR, 2010).

3. FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME: VASOCLUSÃO X HEMÓLISE

A alteração clássica do eritrócito na AF é a falcização, e se constitui um dos eventos fisiopatológicos primários da doença, que tem como resultante os fenômenos vasoclusão e hemólise.

A mutação causadora da AF ocorre no cromossomo 11, com a alteração molecular no códon 6, que se configura na substituição da base adenina por timina. Essa troca resulta em uma modificação do aminoácido que se localiza na posição 6 da cadeia β -globina, proteína estrutural da HbA. No lugar de ácido glutâmico se forma valina, resultando na formação da HbS (CARVALHO *et al*, 2014).

Em sua natureza, a HbS é uma molécula hidrofóbica, o que lhe confere baixa solubilidade. Após a desoxigenação, resíduos hidrofóbicos da desoxi-HbS se agrupam para formar um polímero rígido, provocando no eritrócito a alteração conformacional que lhe dá a forma de foice, esta normalmente reversível havendo reoxigenação da hemácia (ODIÈVRE *et al*, 2011).

Entretanto, a repetição frequente desse processo pode ocasionar lesões estruturais na membrana do eritrócito e no microambiente intracelular, tornando a célula permanentemente conformada em foice, mesmo após a reoxigenação. O eritrócito se torna rígido e frágil, com vida-média reduzida, contribuindo o desenvolvimento de fenômenos vasoclusivos e anemia hemolítica, respectivamente (CONRAN *et al*, 2009).

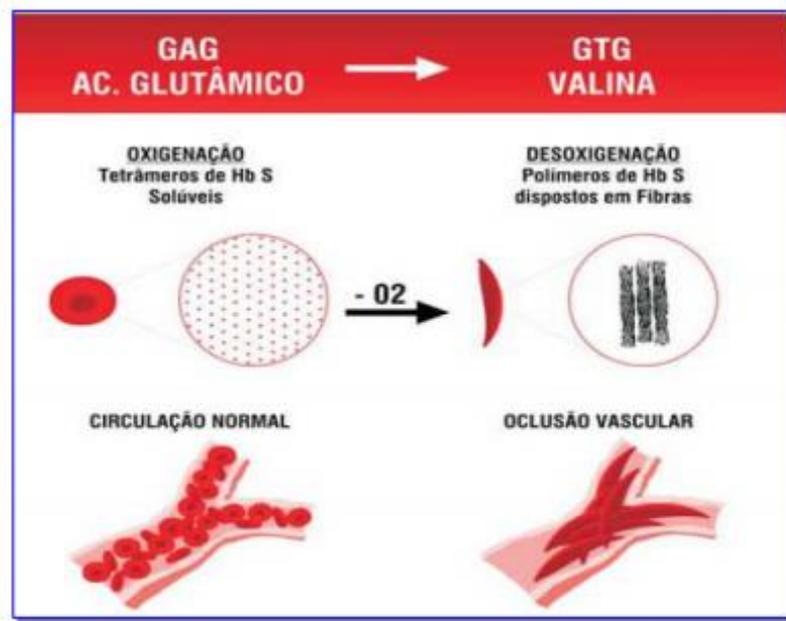


Figura 1: Bases fundamentais do curso clínico da anemia falciforme.

A mutação genética que promove a troca do ácido glutâmico pela valina promove a geração da HbS, uma hemoglobina que quando desoxigenada promove a formação de polímeros insolúveis, que transforma o eritrócito numa célula rígida que é capaz de promover obstrução de fluxo sanguíneo na microcirculação (vasocclusão). Adaptado de Lobo *et al* 2007.

O processo de vasocclusão compreende várias etapas que envolvem interações entre eritrócitos falciformes, leucócitos ativados, endotélio, plaquetas e proteínas plasmáticas. O conteúdo e membrana anormal dos eritrócitos causam lesão e ativação endotelial devido à sua alta adesividade celular, promovendo a liberação de citocinas, fatores de crescimento, ativação e adesão de leucócitos, plaquetas e obstrução da microcirculação. Em suma, os

tecidos não são apenas subperfundidos, mas expostos a esse ambiente inflamatório exacerbado cronicamente (PLATT, 2000).

Vasoclusão recorrente, lesão de IR e ativação endotelial induzem uma resposta inflamatória contínua, que envolve níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e diminuição de biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) associado ao estresse oxidativo (CHAING & FRENETTE, 2005). Essas interações são reguladas por citocinas secretadas pelas células T e NK, assim como por moléculas de adesão, e, conseqüentemente, a resposta imune está implicada na iniciação e desenvolvimento da crise de vasoclusão (MUSA *et al*, 2010).

Além de promover a vasoclusão o eritrócito em foice promove hemólise. É notável que o mecanismo dominante seja a hemólise extravascular, que decorre do reconhecimento e fagocitose destes eritrócitos por macrófagos no baço, na medula de óssea e no fígado, e este processo acontece sem a liberação de hemoglobina no plasma. Por sua vez, a hemólise intravascular decorre da lise das hemácias falciformes e este processo promove a liberação de diversas substâncias que podem desencadear uma resposta inflamatória. Em relação a outras anemias hemolíticas, portadores de anemia falciforme não costumam apresentar esplenomegalia devido aos repetidos episódios de vasoclusão, os quais ocasionam fibrose e atrofia do baço. Dessa forma é comum o paciente apresentar-se pálido ou icterico. (RAMALHO,2003; MENDONÇA, 2016).

Nesse contexto, é possível agrupar as alterações fisiopatológicas, desde o nível molecular às manifestações clínicas. No nível molecular estão presentes a mutação da hemoglobina, polimerização da hemoglobina desoxigenada, falcização e alterações de membrana. No nível de tecidos e órgãos, estão presentes a adesão celular ao endotélio, hipóxia local, isquemia, inflamação, lesão microvascular, hemólise, ativação da coagulação e depleção de óxido nítrico (NO). E por fim, no nível das manifestações clínicas, há apresentação de dor e insuficiência de múltiplos órgãos (ZAGO & PINTO, 2007).

4. HEMÓLISE E INFLAMAÇÃO ESTÉRIL

A discussão sobre a formação de quantidade elevada de diversos tipos de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que são liberados no plasma a partir da hemólise intravascular, processo que acontece na AF, é de particular relevância para esta revisão.

A destruição excessiva de hemácias na circulação promove liberação de grande quantidade de DAMPs no plasma que podem desencadear uma resposta inflamatória se estes não forem neutralizados rapidamente pelo mecanismo de proteção inata do organismo. Por isso pode-se concluir que a hemólise a partir de DAMPs promove uma resposta inflamatória “estétil” (MENDONÇA *et al*, 2016).

O heme é uma molécula inflamatória hidrofóbica que exerce múltiplos efeitos inflamatórios, ativando leucócitos e promovendo sua migração, regulando moléculas de adesão e expressão de citocinas e aumentando a produção de oxidantes e peroxidação lipídica. (DUTRA & BOZZA, 2015).

Importante enfatizar que o heme, mas não a porção da porfirina sem o ferro, somente ele, pode atuar como um DAMP promovendo a formação do inflamassoma em macrófagos. O inflamassoma é um complexo multiprotéico citosólico composto por um receptor semelhante ao NOD junto a uma proteína adaptadora associada à apoptose e a uma proteína contendo um CARD (ASC) e adicionado a caspase-1. A montagem do inflamassoma é necessário para o processamento de pro-IL-1 β em IL-1 β (DUTRA *et al*, 2014).

Além da formação do inflamassoma, devido à sua hidrofobicidade, o heme pode se inserir e danificar bicamadas lipídicas presentes nas organelas. Ele também se liga e oxida proteínas ou lipídeos, gerando moléculas reativas, incluindo óxidos de baixa densidade e lipoproteína, gerando uma resposta inflamatória a partir da atividade citotóxica. Como resultado destas reações oxidantes, heme pode induzir espécies reativas significativas de oxigênio (ERO) e, portanto, o estresse oxidativo (WAGENER *et al*, 2003).

Não só o heme pode funcionar com DAMP no processo de hemólise. No caso dos glóbulos vermelhos, o ATP pode ser liberado durante sua lise celular. Há relatos que apontam que não somente a lise provoca esta liberação, mas também quando os eritrócitos estão sujeitos a hipóxia, bem como ao estresse oxidativo, processos vistos na AF (SPRAGUE *et al*, 2007).

O ATP extracelular pode atuar como uma potente molécula sinalizadora via a ativação de receptores P2 purinérgicos, por exemplo, a ligação de ATP ao receptor P2X7 em células inflamatórias pode ativar a família de receptores semelhantes a NOD, contendo NLRP3 e gerando a formação de inflamassoma, devido ao efluxo de potássio via abertura de canal de cátions (DUTRA *et al*, 2014).

Outros DAMPs potenciais que podem ser liberados pelos eritrócitos incluem algumas das proteínas de choque térmico (Hsp). A Hsp70 foi identificada em eritrócitos maduros, e pode estimular monócitos, macrófagos e células dendríticas via TLR2 e 4 e CD14. Os níveis elevados de Hsp70 no plasma, têm sido descritos em indivíduos com AF durante o período vasoclusão (ADEWOYE *et al*, 2005).

A IL-33 é uma citocina da família IL-1 associada a via do receptor ST2, induzindo a resposta imune inata. A fonte principal de IL-33 podem ser os glóbulos vermelhos, que foram capazes de liberar excessivas quantidades desta citocina após a sua hemólise. Os níveis circulantes de IL-33 mostram uma correlação positiva com o grau de hemólise em pacientes com AF. Dada a capacidade da IL-33 para induzir a secreção de citocinas e promover respostas de citotoxicidade a partir da ativação de células NK e subconjuntos de células T reguladoras, este DAMP pode, possivelmente, mediar alguns dos processos inflamatórios que são observadas na sequência de hemólise (MOLOFSKY *et al*, 2015).

A libertação de grandes quantidades de DAMPs durante a hemólise, tem potencial para ativar múltiplas vias inflamatórias. Estudos sugerem que o heme, é capaz de ativar caminhos inflamatórios convergentes, tais como a sinalização de TLR, e formação de inflamosomas, sugerindo que este DAMP tanto ativa e amplifica a inflamação. Logo, a hemólise representa um mecanismo inflamatório que potencialmente contribui para as manifestações clínicas que têm sido associadas à AF, tais como priaprismo, hipertensão pulmonar e presença de úlceras nos membros inferiores, contribuindo assim como a ativação endotelial, vasoclusão e lesões teciduais / orgânicas na AF (MENDONÇA *et al*, 2016).

5. VASOCLUSÃO, HEMÓLISE, LESÃO ENDOTELIAL E ADESÃO CELULAR

5.1 VASOCLUSÃO, HEMÓLISE E O ENDOTÉLIO

Um dos eventos primários na gênese do estado inflamatório da AF é a ativação e lesão endotelial, e pelo menos dois fatores contribuem primariamente para este processo: os eritrócitos em foice e a adesão de células eritróides ao endotélio. Os eventos vasoclusivos subclínicos envolvendo um bloqueio transitório dos leitos vasculares por eritrócito e adesão de eritrócitos podem ser muito frequentes. Ocorrências repetidas e aleatórias de tais eventos afetariam adversamente a função das células endoteliais e contribuiriam para lesões múltiplas de órgãos (KAUL & HEBBEL, 2000).

Esse processo é mediado principalmente pelas consequências da falcização eritrocitária em um ambiente de estresse oxidativo, que podem ser exemplificadas pelo o aumento da exposição de receptores de adesão, e pela liberação de conteúdo celular, causada pela hemólise intravascular (FRENETTE & ATWEH, 2007).

Em um estudo utilizando modelo animal com camundongos falciformes, submetidos a hipóxia, seguidos de reoxigenação, observou-se um fluxo de rolamento nas vênulas dos animais maior do que o normal e aumento de adesão de leucócitos nestes animais. Também foi observado uma resposta inflamatória distinta caracterizada por um número aumentado de leucócitos. A infusão de um anticorpo anti-P-selectina, mas não um anticorpo anti-E-selectina, inibiu completamente esta resposta inflamatória e aumentou significativamente as taxas de cisalhamento na parede endotélio. Estes achados sugerem que a interação leucócito-endotélio contribui para eventos vasoclusivos nos camundongos falciformes (KAUL & HEBBEL, 2000).

Não apenas a lesão IR pode estar envolvida na fisiopatologia da vasoclusão na AF. Após a destruição dos glóbulos vermelhos nos vasos sanguíneos, quantidade significativa de hemoglobina e outros conteúdos celulares são liberados para a circulação. Se esta hemoglobina não é rapidamente neutralizada por proteínas de eliminação (haptoglobina e hemopexina), podem ocorrer danos significativos vasculares, perivasculares e endoteliais (SCHAER, 2014).

A indução de hemólise em camundongos C57BL / 6 (utilizando infusão intravascular de água, resultando em níveis de hemoglobina plasmática que foram semelhantes aos observados em um modelo de camundongos falciforme) promoveu uma lesão vascular quase imediata e uma vasta resposta inflamatória, caracterizada pelo recrutamento extenso de leucócitos para as paredes dos vasos e microcirculação (ALMEIDA, 2015).

A própria HbS liberada no vaso e espécies reativas de oxigênio (ERO) contribuem para a lesão e ativação do endotélio. A liberação do ferro do grupo heme pela hemólise estimula o endotélio a produzir endotelina-1 (ET-1), de ação vasoconstritora e inflamatória. Leva também a ativação do fator de transcrição nuclear fator- κ B (NF κ B), que tem como consequência o aumento da expressão moléculas de adesão endotelial, tais como a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e E-selectina (ODIÈVRE *et al*, 2011; KATO *et al*, 2005). Estas moléculas promovem a interação do endotélio com eritrócitos, leucócitos e plaquetas, contribuindo juntamente com a ET-1 para

ativação e liberação de citocinas inflamatórias por parte dos leucócitos e endotélio, são estas IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e fator estimulador de colônia dos macrófagos e granulócitos (ZAGO & PINTO, 2007; CONRAN *et al*, 2007).

Logo, o heme exerce múltiplos efeitos inflamatórios, ativando leucócitos e sua migração, regulando moléculas de adesão e expressão de citocinas, promovendo aumento da produção de oxidantes e peroxidação lipídica.

5.2 VASOCLUSÃO, HEMÓLISE E O ERITRÓCITO

São conhecidas, e já foram amplamente estudadas as principais moléculas de adesão expressas nos eritrócitos falciformes conferindo-lhes maior adesividade. Inclusive, indivíduos com AF apresentam maior número de reticulócitos, células de maior capacidade adesiva comparadas a reticulócitos de indivíduos normais (ODIÈVRE *et al*, 2011).

Nos eritrócitos falciformes, as principais moléculas de adesão são a integrina VLA-4 (integrina $\alpha 4\beta 1$), a CD36 e a molécula de adesão celular/Lutheran (BCAM/Lu), proteína produzida pelo gene do grupo 20-superoxido Lutheran. A integrina VLA-4 (integrina $\alpha 4\beta 1$) se liga diretamente ao VCAM-1 (mais específico do endotélio da microcirculação), e também à fibronectina, proteína da matriz extracelular (subendotelial). A molécula CD36 é expressa apenas nos reticulócitos e se adere indiretamente a outro ligante CD36 endotelial, por meio da ponte plasmática de trombospondina ou pelo fator de von Willebrand (mais específico de grandes vasos). A BCAM/Lu promove interações entre célula e matriz extracelular, ligando-se a laminina e vitronectina via AMP cíclico, e entre célula-célula, ligando-se a outros eritrócitos (TELEN, 2000; CONRAN *et al*, 2009).

5.3 VASOCLUSÃO, HEMÓLISE E LEUCÓCITOS

Em relação aos leucócitos, estes geralmente são encontrados ativados na circulação de indivíduos com AF, e uma contagem elevada dessas células se relaciona com manifestações clínicas mais graves. Possuem papel notavelmente importante em etapas iniciais do processo de vasoclusão, principalmente a atuação dos neutrófilos, células de grande volume e rígidas. Seguindo estímulos inflamatórios, estas células são recrutadas para o endotélio ativado de vênulas pós capilares, onde se aderem, e posteriormente interagem com eritrócitos falciformes para formar agregados heterocelulares, levando à redução do fluxo sanguíneo com o aumento do tempo de trânsito capilar da HbS, favorecendo então os eventos vasoclusivos (MANWANI & FRENETTE, 2013; ZHANG *et al*, 2016).

É característico destas interações a expressão leucocitária de determinadas moléculas de superfície, tais como integrinas Mac-1, P-selectina, L-selectina e ligantes de E-selectina, que se ligam a diversos sítios. As integrinas Mac-1 interagem com receptores nos eritrócitos (proteínas do complemento e IgG autóloga), e juntamente com L-selectina e ligantes de E-selectina se ligam a moléculas ICAM-1 e E-selectina do endotélio vascular. A P-selectina promove interação leucócito-plaqueta, além de também interagir com P-selectina endotelial (ZHANG *et al*, 2016; CONRAN *et al*, 2009).

A ativação de neutrófilos desempenha um papel importante na AF. Um estudo identificou que o heme induz a formação de traves extracelulares de neutrófilos (NET). NETs são formadas por cromatina descondensada associada enzimas granulares e as mesmas são liberadas por neutrófilos ativados. Em modelo com camundongos portadores do gene da AF foram identificadas NETs, nos pulmões dos animais e componentes de NETs solúveis no plasma. A presença de NET foi associada à hipotermia e à morte destes. O heme foi identificado como o fator que estimula neutrófilos para liberar NETs *in vitro* e *in vivo*. A diminuição das concentrações plasmáticas de heme pode induzir ou prevenir, respectivamente, a formação de NET (CHEN *et al*, 2014).

A lesão por IR também é caracterizada por recrutamento de leucócitos resultando em disfunção tecidual em vários órgãos incluindo coração, músculo esquelético, pulmões, intestino e pele. As interações leucócito-endotélio envolvem o contato transitório repetido de leucócitos ao longo da superfície endotelial, seguido por sua firme adesão e diapedese. (CARLOS & HARLAN, 1994).

5.4 VASOCLUSÃO, HEMÓLISE E COAGULAÇÃO

Pacientes com AF apresentam estado mantido de hipercoagulabilidade, porquanto já foi estabelecido que, mesmo em período sem crises, em curso estável, níveis de marcadores da geração de trombina se encontram elevados. Os principais marcadores pró-coagulantes encontrados são fator tecidual (FT), dímero-D, complexos de trombina-antitrombina, fator de Von Willebrand e fator ativador de plaquetas. Como fator agregador ao estado de pró-coagulação, apresentam também decréscimo de fatores anticoagulantes naturais, tais como proteína C e proteína S, provocado possivelmente pelo consumo crônico de trombina em excesso (ATAGA & KEY, 2007; ATAGA *et al*, 2008).

Os eritrócitos falciformes apresentam anormalmente a expressão de moléculas de fosfatidilserina em sua superfície externa, lhe conferindo alto poder de adesão além de

umentar a expressão de FT, tido como um dos principais fatores de ativação do estado de hipercoagulação. Contribuem também na gênese do estado de hipercoagulabilidade: a circulação de plaquetas ativadas, que apresentam maior expressão do ligante CD40, pró-coagulante; a liberação, através da hemólise, de fatores consumidores de NO; e lesão causada pelos processos de IR (PROENÇA-FERREIRA *et al*, 2014; ATAGA *et al*, 2008).

5.5 VASOCLUSÃO, HEMÓLISE, ÓXIDO NÍTRICO E ESTRESSE OXIDATIVO

Ainda cooperando na fisiopatologia da vasoclusão, estudos apontam que um ambiente de estresse oxidativo associado às alterações metabólicas do NO cumprem papel importante (KATO *et al*, 2009). O NO é produzido pela enzima NO sintase através do substrato L-arginina, e constitui um vasodilatador endógeno fundamental ampliador do fluxo sanguíneo regional. As consequências de sua diminuição implicam em potencialização do efeito vasoconstrictor da ET-1, e até mesmo em maior produção de ERO, ativação plaquetária e adesão leucocitária (BUNN *et al*, 2010; MORRIS, 2008).

São apontados na literatura diversos mecanismos pelos quais a biodisponibilidade plasmática do NO se torna reduzida, e dois principais são consequência da hemólise intravascular (BUNN *et al*, 2010). Em condições normais a hemoglobina permanece contida pela membrana plasmática, porém, durante a hemólise, a HbS é descompartimentalizada e reage com o NO, consumindo-o, gerando metahemoglobina e nitrato (DONADEE *et al*, 2011). Simultaneamente, a hemólise leva também à liberação da enzima arginase, que limitará a produção de NO através do consumo do substrato L-arginina, desviando seu metabolismo para a formação de outros compostos que não o NO, tais como ornitina, poliaminas e prolina (BAKSHI & MORRIS, 2016).

A constatação dessas alterações contribuiu para o surgimento de subfenótipos associados a hemólise na AF, relacionando sua frequência (alta ou baixa) às manifestações clínicas específicas. Uma alta taxa de hemólise foi associada a hipertensão pulmonar, úlceras em membros inferiores e priapismo. Ademais, a biodisponibilidade da L-arginina tem sido vinculada à mortalidade em outras patologias como malária e doenças cardiovasculares, representando um novo biomarcador independente do genótipo (ADEKILE, 2013; MORRIS, 2011).

O estresse oxidativo na AF se configura no desequilíbrio entre mecanismos oxidantes e antioxidantes. ERO podem lesar moléculas como DNA, lipídeos proteínas e carboidratos, causando disfunção e morte celular. Entre os mecanismos de defesa contra a oxidação estão

os enzimáticos, através das enzimas superóxido dismutase, catalase, NADPH, glutathione peroxidase e NO, bem como os não enzimáticos, tais como a vitamina A, C e E, glutathione reduzida, carotenoides e zinco. Ambos os mecanismos têm atividade reduzida na AF (CHIRICO & PIALOUX, 2012).

Existem também os mecanismos geradores de ERO, que caracterizados pela atividade aumentada na AF, acentuam o desequilíbrio. As lesões de IR induzem a formação de xantina oxidase, que após a restauração do fluxo sanguíneo, rico em oxigênio, gera radicais superóxido, que posteriormente se converte em radicais hidroxila, prejudicial a maioria das substâncias biológicas. Os neutrófilos, aumentados na AF, têm a enzima NADPH em abundância, geradora de ERO na fase final da lesão pós-reperfusão (NUR *et al*, 2011).

Outro mecanismo é a auto-oxidação da Hb, também produtora de radicais superóxido. Estes se convertem em peróxido de hidrogênio, e posteriormente grande parte é neutralizada por antioxidantes citosólicos. A neutralização é limitada, no entanto, pois a HbS se torna parcialmente oxigenada, principalmente sob condições de hipóxia, adquirindo grande afinidade pela membrana plasmática eritrocitária, zona celular relativamente inacessível para o sistema citosólico antioxidante predominante (catalase, glutathione peroxidase), tornando a antioxidação malsucedida (CHIRICO & PIALOUX, 2012; OS 3; MOHANTY *et al*, 2014).

5.6 VASOCLUSÃO, HEMÓLISE, LINFÓCITOS T E CÉLULAS NK

Modelos animais (camundongos) de vasoclusão com células falciformes forneceram evidências preliminares de que a lesão de isquemia- reperfusion (IR) contribui para um ambiente pró-inflamatório causando ativação de leucócitos, migração e adesão, sustentando e propagando a vasoclusão iniciada por eritrócitos em forma de foice. Embora o mecanismo IR em vasoclusão não tenha sido completamente elucidado, evidências implicam as células T NK (NKT) como chave para a propagação de uma cascata inflamatória associada com IR (CASTRO *et al*, 1994).

Em camundongos portadores de AF, a IR aumentou a adesão e a emigração dos leucócitos e aumentou a quantidade de substâncias oxidantes em células endoteliais. Análises de microscopia eletrônica destes animais, indicam que os eritrócitos falciformes interagem primariamente com leucócitos e o endotélio de capilares, levando à obstrução vascular. Entre indivíduos com AF, o aumento da contagem de leucócitos está associado a uma maior

incidência de síndrome torácica aguda, dor, acidentes vasculares cerebrais e morte prematura (FIELD *et al*, 2011).

O papel dos linfócitos T não foi totalmente definido na DF. Estudo demonstrou que o valor médio global de linfócitos T CD3 positivo ou CD8 positivo é significativamente maior em pacientes com AF, mas não existe diferença entre os níveis de linfócitos T CD4 positivo em pacientes com AF e grupo controle (KOFFI *et al*, 2003).

Estudos apontam que agonistas do receptor 2A de adenosina (A2AR) funcionam para reduzir a lesão após isquemia ou trauma em muitos tecidos. Os alvos celulares dos A2ARs inicialmente não estavam claros, e os resultados indicam que, apesar da distribuição generalizada de A2ARs em plaquetas e leucócitos, os agonistas A2a reduzem IR principalmente pelos seus efeitos sobre as células T (ALCHERA *et al*, 2015; DAY *et al*, 2005).

Em 2005, um estudo apontou que a lesão de reperfusão hepática estava associada a expansão e ativação de células T NK. Ao se utilizar um anticorpo que se liga ao CD1d, encontrado apenas em células T NKT e NK, ocorre bloqueio da ativação destas células, gerando proteção contra lesão IR hepática. Estes estudos indicam que as células T que medeiam a IR são células T NK (SHIMAMURA *et al*, 2005).

Os mecanismos pelos quais as células T NK são ativadas na lesão IR não são inteiramente conhecidos. Estudos recentes sugerem que lesão tecidual pode resultar na formação de um glicolípido que pode ativar o TCR de células T NK invariante. Além disso, a ativação das células T NK pode ser facilitada pela ligação da fosfatidilserina à superfície dos receptores da apoptose de células T em células T NK (LEE *et al*, 2010).

Para determinar se as células T NK desempenham um papel na lesão dos tecidos AF, Wallace *et al*. compararam os pulmões de camundongos do tipo selvagem e camundongos AF. As células T NK pulmonares dos animais AF são aumentadas em número em comparação aos animais selvagens. Nos pulmões de camundongos AF as células T NK apresentaram níveis significativamente aumentados de CD69 e IFN- γ em comparação com os animais selvagens. A porcentagem de células T NK pulmonares positivas para IFN- γ aumentou de 5% para 37%, uma diferença de 7,4 vezes. A análise, a partir de imunofenotipagem, de linfócitos pulmonares de camundongos AF revelou que a expressão CXCR3 é significativamente mais

elevada em células T CD4 (6 vezes), células T CD8 (7 vezes), células NK (4 vezes) e células T NK (2 vezes) a partir de NY1DD do que nos controles selvagens (WALLACE *et al*, 2009).

A maioria dos estudos envolvem modelos animais, apenas um estudo disponível observou que existe uma expansão e ativação de células T NK em pacientes com AF comparado a controles americanos saudáveis. Dada a leucocitose em pacientes com AF, é notável que há expansão seletiva de células T NK entre linfócitos, de <1% no sangue nos controles, para uma média de 6% no sangue dos doentes com AF (WALLACE & LINDEN, 2010).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEKILE, Adekunle D. What's new in the pathophysiology of sickle cell disease?. **Medical Principles and Practice**, v. 22, n. 4, p. 311-312, 2013.

ADEREM, Alan; UNDERHILL, David M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual review of immunology**, v. 17, n. 1, p. 593-623, 1999.

ADEWOYE, Adeboye H. et al. Sickle cell vaso-occlusive crisis induces the release of circulating serum heat shock protein-70. **American journal of hematology**, v. 78, n. 3, p. 240-242, 2005.

ALCHERA, Elisa et al. Pharmacological Preconditioning by Adenosine A2a Receptor Stimulation: Features of the Protected Liver Cell Phenotype. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

ALMEIDA, Ana G. et al. Abnormal Myocardial Flow Reserve in Sickle Cell Disease: a Myocardial Contrast Echocardiography Study. **Echocardiography**, v. 25, n. 6, p. 591-599, 2008.

ALMEIDA, Camila Bononi et al. Acute hemolytic vascular inflammatory processes are prevented by nitric oxide replacement or a single dose of hydroxyurea. **Blood**, v. 126, n. 6, p. 711-720, 2015.

ATAGA, Kenneth I. et al. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. **Haematologica**, v. 93, n. 1, p. 20-26, 2008.

ATAGA, Kenneth I.; KEY, Nigel S. Hypercoagulability in sickle cell disease: new approaches to an old problem. **ASH Education Program Book**, v. 2007, n. 1, p. 91-96, 2007.

BAKSHI, Nitya; MORRIS, Claudia R. The role of the arginine metabolome in pain: implications for sickle cell disease. **Journal of pain research**, v. 9, p. 167, 2016.

BANDEIRA, F. M. G. C. et al. Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina "S" detectados através de triagem em sangue de cordão umbilical. **J Pediatr (Rio J)**, v. 75, n. 3, p. 167-71, 1999.

BUNN, H. Franklin et al. Pulmonary hypertension and nitric oxide depletion in sickle cell disease. **Blood**, v. 116, n. 5, p. 687-692, 2010.

CANÇADO, Rodolfo D.; JESUS, Joice A. A doença falciforme no Brasil: [editorial]. **Rev. bras. Hematol. Hemoter**, v. 29, n. 3, p. 204-206, 2007.

CARLOS, Timothy M.; HARLAN, John M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, v. 84, n. 7, p. 2068-2101, 1994.

CARVALHO, Suzana Cardoso et al. Em busca da equidade no sistema de saúde brasileiro: o caso da doença falciforme. **Saúde e Sociedade**, v. 23, n. 2, p. 711-718, 2014

CASTRO, Oswaldo 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. 643-649, 1994.

CHEN, Grace et al. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. **Blood**, v. 123, n. 24, p. 3818-3827, 2014.

CHIANG, Elaine Y.; FRENETTE, Paul S. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 19, n. 5, p. 771-784, 2005.

CHIRICO, Erica N.; PIALOUX, Vincent. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **IUBMB life**, v. 64, n. 1, p. 72-80, 2012.

CONRAN, Nicola et al. Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease. **Annals of hematology**, v. 86, n. 4, p. 255-261, 2007.

CONRAN, Nicola; FRANCO-PENTEADO, Carla F.; COSTA, Fernando F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin**, v. 33, n. 1, p. 1-16, 2009.

DAY, Yuan-Ji et al. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 288, n. 4, p. F722-F731, 2005.

DI NUZZO, Dayana VP; FONSECA, Silvana F. Anemia falciforme e infecções. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 5, p. 347-354, 2004.

DONADEE, Chenell et al. Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. **Circulation**, v. 124, n. 4, p. 465-476, 2011.

DUTRA, Fabianno 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, Fabianno F.; BOZZA, Marcelo T. Heme on innate immunity and inflammation. **The Importance Of Iron In Pathophysiologic Conditions**, p. 248, 2015.

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

FORGET, Bernard G.; BUNN, H. Franklin. Classification of the Disorders of Hemoglobin. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 2, p. a011684, 2013.

FRENETTE, Paul S.; ATWEH, George F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 4, p. 850-858, 2007.

GARCIA, K. Christopher; TEYTON, Luc; WILSON, Ian A. Structural basis of T cell recognition. **Annual review of immunology**, v. 17, n. 1, p. 369-397, 1999.

GHEBREHIWET, Berhane. The complement system: an evolution in progress. **F1000Research**, v. 5, 2016.

KATO, Gregory J. et al. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. **British journal of haematology**, v. 130, n. 6, p. 943-953, 2005.

KATO, Gregory J. et al. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **American journal of hematology**, v. 84, n. 9, p. 618-625, 2009.

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

KOFFI, K. Gustave et al. Reduced levels of T-cell subsets CD4+ and CD8+ in homozygous sickle cell anaemia patients with splenic defects. **The Hematology Journal**, v. 4, n. 5, p. 363-365, 2003.

LEE, Hyun-Hee et al. Apoptotic cells activate NKT cells through T Cell Ig-Like Mucin-Like-1 resulting in airway hyperreactivity. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 9, p. 5225-5235, 2010.

LIMA, Flávia Afonso; CARNEIRO-SAMPAIO, Magda. O papel do timo no desenvolvimento do sistema imune. **Pediatria (São Paulo)**, v. 29, n. 1, p. 33-42, 2007.

LOUREIRO, Monique M.; ROZENFELD, Suely; PORTUGAL, Rodrigo D. Acute clinical events in patients with sickle cell disease: epidemiology and treatment. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 30, n. 2, p. 95-100, 2008.

MACKAY, Ian; ROSEN, Fred S. The immune system. **N Engl J Med**, v. 343, n. 1 Pt 1, p. 37-49, 2000.

MANWANI, Deepa; FRENETTE, Paul S. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. **Blood**, v. 122, n. 24, p. 3892-3898, 2013.

MARTINS, Wde A. et al. Cardiovascular changes in sickle cell anemia. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 70, n. 5, p. 365, 1998.

MCGANN, Patrick T. Sickle cell anemia: an underappreciated and unaddressed contributor to global childhood mortality. **The Journal of pediatrics**, v. 165, n. 1, p. 18-22, 2014.

MEIER, Emily Riehm; MILLER, Jeffery L. Sickle cell disease in children. **Drugs**, v. 72, n. 7, p. 895-906, 2012.

MENDONÇA, Rafaela; SILVEIRA, Angélica AA; CONRAN, Nicola. Red cell DAMPs and inflammation. **Inflammation Research**, p. 1-14, 2016.

MESQUITA JÚNIOR, Danilo et al. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

MOHANTY, Joy; NAGABABU, Enika; RIFKIND, Joseph M. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 84, 2014.

MOLOFSKY, Ari B.; SAVAGE, Adam K.; LOCKSLEY, Richard M. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury, and inflammation. **Immunity**, v. 42, n. 6, p. 1005-1019, 2015.

MORRIS, Claudia R. Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. **ASH Education Program Book**, v. 2008, n. 1, p. 177-185, 2008.

MORRIS, Claudia R. Vascular risk assessment in patients with sickle cell disease. **Haematologica**, v. 96, n. 1, p. 1-5, 2011.

MURAO, Mitiko; FERRAZ, Maria Helena C. Traço falciforme: heterozigose para hemoglobina S. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 29, n. 3, p. 223-225, 2007.

MUSA, Bolanle OP et al. Pattern of serum cytokine expression and T-cell subsets in sickle cell disease patients in vaso-occlusive crisis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 4, p. 602-608, 2010.

NUR, Erfan et al. Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. **American journal of hematology**, v. 86, n. 6, p. 484-489, 2011.

ODIÈVRE, Marie-Hélène et al. Pathophysiological insights in sickle cell disease. **The Indian journal of medical research**, v. 134, n. 4, p. 532, 2011.

PLATT, Orah S. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 106, n. 3, p. 337-338, 2000.

PROENÇA-FERREIRA, Renata et al. Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e89012, 2014.

REES, David C.; WILLIAMS, Thomas N.; GLADWIN, Mark T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018-2031, 2010.

SCHAER, Dominik J. et al. Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways—basic science, clinical perspectives, and drug development. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 415, 2014.

SCHNOG, J. B. et al. Sickle cell disease; a general overview. **Neth J Med**, v. 62, n. 10, p. 364-74, 2004.

SCHUSTER, Iona et al. “Natural regulators”: NK cells as modulators of T cell immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 235, 2016.

SERJEANT, Graham R. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 350, n. 9079, p. 725-730, 1997.

SERJEANT, Graham R. The natural history of sickle cell disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 10, p. a011783, 2013.

SHIMAMURA, Kazuhiko 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.

SPRAGUE, Randy S.; STEPHENSON, Alan H.; ELLSWORTH, Mary L. Red not dead: signaling in and from erythrocytes. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 18, n. 9, p. 350-355, 2007.

TELEN, Marilyn J. Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease. In: **Seminars in hematology**. WB Saunders, 2000. p. 130-142.

VICHINSKY, Elliott. et al. Comparison of organ dysfunction in transfused patients with SCD or beta thalassemia. **American Journal of Hematology**, v. 80, n. 1, p. 70-74, 2005.

VIVAS, Wanessa L. P. et al. Heterozigose para hemoglobinopatias em doadores de sangue do Centro de Hemoterapia de Sergipe. **Rev. bras. hematol. hemoter**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 284-287, 2006.

WAGENER, Frank A. D. T. G. et al. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. **Pharmacological reviews**, v. 55, n. 3, p. 551-571, 2003.

WALLACE, Kori L. et al. NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN- γ and CXCR3 chemokines. **Blood**, v. 114, n. 3, p. 667-676, 2009.

WALLACE, Kori L.; LINDEN, Joel. Adenosine A2A receptors induced on iNKT and NK cells reduce pulmonary inflammation and injury in mice with sickle cell disease. **Blood**, v. 116, n. 23, p. 5010-5020, 2010.

WATANABE, Alexandra Mitiru. **Prevalência da anemia falciforme no estado do Paraná**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

ZAGO, Marco Antonio; PINTO, Ana Cristina Silva. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev bras hematol hemoter**, v. 29, n. 3, p. 207-14, 2007.

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

II. NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

Information for authors

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy

The **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, ISSN 1516 8484, the official scientific publication of the Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea, Associazione Italo-Brasiliiana di Ematologia and Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica aims to promote scientific development in Hematology, Transfusion Medicine and related areas. All manuscripts, after initial acceptance by the editors, will be sent for analysis by two peer reviewers. Anonymity is guaranteed throughout the evaluation process. When considered necessary, a list of modifications will be sent to authors to correct their work or justify their decision not to do so.

The responsibility for opinions expressed in articles is solely of the authors.

Manuscripts should not be submitted simultaneously to more than one journal. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. Reproduction, in full or partial, translated into other languages requires prior permission of the editors.

The journal publishes the following sessions: Original Article, Special Article, Review Article, Updates in the Specialty, Case report, Letter to the Editor, Images in Clinical Hematology, Editorial, Scientific Comment and What is the Evidence. Other types of publications of interest in the area will be published at the discretion of the editors. All manuscripts must be submitted in English.

1. PREPARATION OF THE MANUSCRIPT

1.1 General information

For any manuscript to be evaluated, it must be accompanied by the following documentation:

- Conflict of interest: Situations that may improperly influence the development or the conclusions of the work such as participation in drug- or equipment-producing companies cited or used in the work, as well as competitors of these companies should be mentioned. Financial assistance, payments received for consultancies, relationships related to employment, etc. are also considered sources of conflict.
- Approval of the study by a Research Ethics Committee recognized by the National Research Ethics Committee (CONEP);
- Articles that deal with clinical research involving human beings must include a statement in the Methods Section that all study participants signed an informed consent form. Authors should also confirm that the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2008;
- For works involving animal experimentation, the authors should confirm in the Methods Section that the study followed the rules contained in the Ethical Code for Animal Experimentation of the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) [WHO Chronicle 1985; 39 (2): 51-6] and the principles of the Brazilian College of Animal experimentation - COBEA (www.cobea.org.br). Authors must complete the Declaration - Statement of Human and Animal Rights. All randomized controlled trials and clinical trials submitted for publication must be registered in a clinical trials database. This is a guideline of the International Clinical Trial Registry Platform (ICTPR) of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). The instructions for the registry are available at <http://www.icmje.org/clintrialup.htm> and registration can be attained in the Clinical Trials Database of the National Library of Medicine available at <http://clinicaltrials.gov/ct/gui>.

1.2 Technical requirements

1. **Article identification:** a) A concise however informative title; b) Complete names of authors without abbreviations and their institutions; c) Department and official name of the institution(s) to which the work should be attributed; d) Name, full address including telephone and e-mail of corresponding author; e) financial support (if any).
2. **Abstract and keywords:** Abstract in English of not more than 250 words. For Original Articles this should be structured with background, method, main results and conclusion. For the other article types, the abstract need not be structured but should contain information illustrating the importance of the work. Specify up to five keywords, which define the theme

of the paper. The keywords should be based on MeSH (Medical Subject Headings) from the National Library of Medicine available at: <http://www.sgponline.com.br/rbhh/sgp/naveg/mesh.asp>. For clinical trials, indicate the International Clinical Trials Registry Number below the summary.

3. **Manuscript content:** **a) Original Article:** Used to publish the results of scientific research, it must be original and should comprise the following: Introduction, Objective, Method, Results, Discussion, Conclusion and References. The work should not exceed 4000 words (including references), up to 6 authors, up to 7 tables, illustrations and photos and up to 30 references; **b) Special Article:** With the same structure as original articles, Original Articles are reclassified by the Editor depending on their importance; **C) Review Articles:** narrative reviews addressing an important issue in the specialty. These articles should not exceed 5000 words (including references), a maximum of 7 tables, Figures and Photos and up to 60 references; **d) Update in the Specialty:** on a theme, method, treatment, etc. It must contain a brief history of the topic, its current state of knowledge and the reasons for the work; study methods (data sources, selection criteria), hypotheses, study lines, etc., criteria similar to review articles; **e) Case Report:** should have an introduction with a brief literature review, a description of the case showing significant results for the diagnosis and differential diagnoses (if any), discussion or comments and references. It should not exceed 1800 words, two tables, illustrations and photographs, up to four authors and ten references; **f) Letters to the Editor:** a maximum of 1000 words (including references), three authors, and two illustrations; **g) Images in Clinical Hematology:** Maximum 100 words, two images, three authors and three references; **h) Scientific comments:** will only be accepted by invitation of the editors.

4. **Acknowledgements:** Should be addressed to collaborators who deserve recognition, but whose participation does not justify their inclusion as an author such as technical assistants, as well as financial support received.

5. **References:** References should always be numbered in the order they appear in the text. The format must be based on the “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals” guidelines proposed by the International Committee of Medical Journal Editors and updated in 2009, as follows: the titles of journals should be abbreviated following the List of Journals Indexed in Index Medicus of the National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Cite the first six authors after which add the words et al.

1.3 Examples of references: Printed documents

- **Journals:** Padley DJ, Dietz AB, Gastineau DA. Sterility testing of hematopoietic progenitor cell products: a single-institution series of culture-positive rates and successful infusion of culture-positive products. *Transfusion*. 2007;47(4):636-43.
- **Books:** Chalmers J. Clinician's manual on blood pressure and stroke prevention. 3rd ed. London: Science Press; 2002. 70 p. Richardson MD, Warnock DW. Fungal Infection Diagnosis and Management. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science Ltd Editorial Offices; 1997. 249 p.
- **Book chapters:** F. Reyes. Lymphocyte differentiation. In P Solal-Céligny, N Brousse, F Reyes, C Gisselbrecht, B Coiffier. *Non-Hodgkin's Lymphomas*. Paris: Éditions Frison-Roche; 1993. p.19-29.
- **Annals:** Souza AM, Vaz RS, Carvalho MB, Arai Y, Hamerschilak N. Prevalência de testes sorológicos relacionados à hepatites B e não-A, não-B em doadores de sangue. In: 19º Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia / 26º Congresso da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia; 2003 Ago 6-9; São Paulo, 2003. Anais. p.103.
- **Theses:** Sandes AF. Caracterização imunofenotípica da diferenciação eritrocitária, granulocítica e megacariótica em pacientes com síndromes mielodisplásicas [thesis]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2009. 126p.

1.4 Electronic documents

- **Articles in Periodicals:** Almeida ID, Coitinho AS, Juckowsky CA, Schmalfluss T, Balsan AM, Röhsig LM. Controle de esterilidade de produtos de células progenitoras hematopoéticas do sangue periférico. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet] 2010 [cited 2010 Jun 10]; 32(1):23-8. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v32n1/aop03010.pdf>
- **Books:** Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical methods. The history, physical, and laboratory examinations*. 3rd ed. [Internet]. Boston: Butterworths; 1990. [cited 2010 Jun 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cm>
- **Illustrations and photos:** Must have a resolution of at least 1000 dpi. Color figures should be in CMYK and will be published in color only if essential and must be in TIFF, JPEG or CDR format. Do not send the figures within the text.
- **Tables:** should be numbered consecutively using Arabic numerals and cited in the text in numerical order. If the table requires special symbols, it should be sent as a high resolution image (1000 dpi) in TIFF or JPG format.

2. SUBMISSION

The submission of the manuscript must be via the website of the Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, (Journal of Hematology and Hemoterapy) www.rbhh.org. A copyright transfer form (available on the website) must be completed and signed by all authors and sent to the editorial office e-mail brazilbloodjournal@yahoo.com.br.

When a manuscript is accepted for publication, the author(s) will be requested to complete a conflict of interest form which must be sent to the editorial office. It is the responsibility of authors to obtain written permission to reproduce any previously published data included in the manuscript.

The editors can publish papers that do not exactly follow the instructions after careful evaluation always taking into account the interests of the readership.

Correspondence address:

Fernando Ferreira Costa
Editor in Chief
Rua Carlos Chagas, 480
Campinas, SP, Brazil
CEP: 13083-970

III. ARTIGO CIENTÍFICO

PERFIL DE LINFÓCITOS T E CÉLULAS NK EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

T AND NK LYMPHOCYTE PROFILE IN PATIENTS WITH SICKLE CELL DISEASE

Autores:

Thiago Piloto de Andrade

Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe

Priscila Oliveira Percout

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.

Instituição:

Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe. Endereço: Rua Claudio Batista
S/Nº Sanatório - CEP: 49.060-100

Correspondência:

Thiago Piloto de Andrade: Rua Armando Barros nº 81, Condomínio Flamboyant, Apto. 1101,
Bairro Luzia CEP 49045-080 - Aracaju-SE, Brasil. Telefone: (79) 998371751.
tgpiloto@gmail.com

RESUMO

INTRODUÇÃO: A fisiopatologia da anemia falciforme (AF) abrange interações complexas entre o eritrócito, endotélio, leucócitos e mediadores inflamatórios. Conhecer a participação de linhagens de linfócitos T e células NK pode contribuir para o entendimento da sua fisiopatologia, além de futuras estratégias terapêuticas. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de linfócitos T, células NK e linfócitos multifuncionais em pacientes com AF.

MÉTODOS: Trata-se de um estudo seccional, no qual foram coletadas uma amostra de sangue periférico de paciente homozigoto para HbS e outra de heterozigoto (HbAS), as quais foram comparadas com amostra de indivíduo saudável (HbAA). A determinação dos subtipos de linfócitos foi realizada a partir de imunofenotipagem, por citometria de fluxo.

RESULTADOS: O 1º tubo avaliou o perfil de linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8, com os respectivos resultados: SS 22,0% e 19,7%; AS 39,4% e 22,9%; AA 33,6%, 29,8%. A positividade para IL2, INF γ e TNF α , apresentou, respectivamente: SS 0,75%, 0,14%, 0,34%; AS 1,66%, zero, 0,32%; AA 2,28%, 0,013%, 0,013%. O 2º avaliou a presença de células T reguladoras, sem grande percentual em nenhuma das amostras. O 3º tubo avaliou a presença de células NK: SS 2,9%, AS 0,60% e AA 0,004%.

CONCLUSÃO: Os resultados foram discrepantes com a literatura quanto a população de linfócitos T CD8. Entretanto, corroboraram com a mesma sugerindo um gradiente de distribuição de células NK entre os indivíduos. São preliminares e deverão ser confirmados em amostra adequada. Contudo, são promissores em identificar alvos terapêuticos e estratégias de prevenção, visando retardar complicações crônicas da AF, e condições clínicas ideais em pacientes elegíveis para transplante de células-tronco hematopoiéticas.

PALAVRAS-CHAVE: Anemia falciforme, subpopulações de linfócitos, linfócitos T, citometria de fluxo, células matadoras naturais.

ABSTRACT

BACKGROUND: The pathophysiology of sickle cell anemia (SCA) encompasses complex interactions between the erythrocyte, endothelium, leukocytes and inflammatory mediators. Knowing the participation of T lymphocyte and NK cell lines may contribute to the understanding of its pathophysiology, as well as future therapeutic strategies. The aim of this study was to evaluate the profile of T lymphocytes, NK cells and multifunctional lymphocytes in patients with SCA.

METHODS: This was a sectional study in which peripheral blood samples were collected, one of which was homozygous for HbS and one for heterozygous (HbAS), which were compared with a healthy individual sample (HbAA). The determination of lymphocyte subtypes was performed from immunophenotyping by flow cytometry.

RESULTS: The first tube evaluated the CD4 T lymphocyte and CD8 T lymphocyte profiles, with the respective results: SS 22.0% and 19.7%; AS 39.4% and 22.9%; AA 33.6%, 29.8%. The positivity for IL2, INF γ and TNF α presented, respectively: SS 0.75%, 0.14%, 0.34%; AS 1.66%, zero, 0.32%; AA 2.28%, 0.013%, 0.013%. The second evaluated the presence of regulatory T cells, without a large percentage in any of the samples. The third tube evaluated the presence of NK cells: SS 2.9%, AS 0.60% and AA 0.004%.

CONCLUSION: ONCLUSION: The results were discrepant with the literature regarding the population of CD8 T lymphocytes. However, they corroborated with it, suggesting a gradient of NK cell distribution among individuals. They are preliminary and should be confirmed in an appropriate sample. However, they are promising to identify therapeutic targets and prevention strategies, aimed at delaying chronic complications of SCD, and optimal clinical conditions in patients eligible for hematopoietic stem cell transplantation.

KEYWORDS: Sickle cell anemia, lymphocytes subsets, T-lymphocyte, flow cytometry, NK Cell.

INTRODUÇÃO

A Anemia Falciforme (AF) é um exemplo clássico de que uma alteração mínima na estrutura de hemoglobina é capaz de provocar, sob determinadas circunstâncias, uma singular e importante redução na sua solubilidade gerando uma doença com fisiopatologia complexa que abrange aspectos que envolve o processo de hemólise, vaso-oclusão e inflamação.

A visão clássica da AF inicialmente concentrou-se apenas no defeito genético primário, a polimerização da HbS. O eritrócito em foice e rígido leva a obstrução do fluxo sanguíneo causando sofrimento aos tecidos, de forma aguda e cronicamente, devido a má perfusão. Porém uma visão mais complexa da fisiopatologia, consegue definir que a célula anormal apresenta alteração na estrutura de sua membrana que provoca um dano endotelial o qual desencadeia uma resposta inflamatória associada a expressão de moléculas de adesão e liberação de interleucinas, promovendo a adesão de leucócitos, plaquetas e obstrução de microcirculação [1]. Logo os tecidos não são apenas expostos a má perfusão, mas sim, a uma resposta inflamatória associada a lesão endotelial, a citocinas, fatores de crescimento e adesão celular.

O evento de vaso-oclusão envolve interações complexas entre o eritrócito, o endotélio e leucócitos. Essas interações são reguladas por citocinas secretadas pelas células T, assim como por moléculas de adesão, e, conseqüentemente, a resposta imune está implicada na iniciação e desenvolvimento da crise de vaso-oclusão [2].

Em resposta imune normal a patógenos, os linfócitos T *naive*, a partir da apresentação de antígenos, tornam-se células efetoras: linfócitos T auxiliares (CD4 positivo) e T citotóxico (CD8 positivo). Os linfócitos T atuarão na resposta imune específica regulando-a através de produção de citocinas, promovendo dois tipos de resposta imune (TH1 e TH2). As células *natural killer* (NK) participam do processo imune inato e adaptativo, com capacidade de produzir grandes quantidades de citocinas, que auxiliam também na resposta TH1 e TH2 [3].

As células T auxiliares, T citotóxicas e T NK são personagens fundamentais no fenômeno de vasoclusão. Lesão de isquemia-reperusão (IR) desencadeia uma cascata inflamatória que é iniciada pela ativação de células T e NK. Em modelo animal já foi observado que a lesão de IR da anemia falciforme promove elevação de interleucinas associadas a atividade de células NK no baço, fígado e pulmão [4].

Em um estudo que avaliou subtipo de linfócitos em portadores de AF, observou-se um nível elevado de linfócitos CD3 e CD8 positivos, em todos os pacientes com AF, estando estes estáveis clinicamente, fora de crise vaso-oclusiva ou infecção [5].

Assim, o conhecimento da participação de cada linhagem de linfócitos T e NK que estão envolvidos no complexo processo de vaso-oclusão pode contribuir para o entendimento da sua fisiopatologia, e, a partir daí, para a definição de estratificadores de risco relacionado a complicações, além de futuras estratégias terapêuticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo seccional em que foram avaliadas amostras de sangue periférico de dois pacientes, sendo um deles portador de anemia falciforme (SS) e outro, de traço falciforme (AS), atendidos Serviço de Hematologia Pediátrica do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, as quais foram comparadas com amostra de um controle (adulto jovem saudável, padrão AA).

A amostra do paciente SS foi coletada na ausência de crise álgica, infecção e internação nas últimas quatro semanas. O mesmo não havia recebido transfusão sanguínea nos últimos 120 dias, não era tratado com hidroxureia e nem fez uso de anti-inflamatórios nas últimas 24 horas.

Para a determinação dos subtipos de linfócitos T e células NK foram coletados 15 mL de sangue periféricos dos indivíduos estudados, em solução de heparina, seguida do isolamento de células mononucleares de sangue periférico após centrifugação do mesmo em solução de Ficoll-Hypaque, técnica conhecida como *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC). Em seguida foram plaqueadas quantidades fixas de linfócitos (1×10^6 células) associados a anticorpos da BD Biosciences®.

No primeiro tubo foram adicionados os seguintes anticorpos CD4 FITC, CD8 PEcy5, IL2 BV421, TNF PE e INF PEcy7 a fim de identificar linfócitos T auxiliares, citotóxico e interleucinas. No segundo tubo foram adicionados CD16 FITC, CD28 BV421, FOXP3 PE, CD3 PEcy7, CD25 V450 e CD4 APC a fim de identificar linfócitos T reguladores. E por fim, no terceiro tubo foram adicionados CD56 FITC, IL-17 PE, CD3 PEcy7 e CD69 APCy7 para a identificação de células NK. As análises foram realizadas através do citômetro de 8 cores da BD Biosciences®, a partir do software Infinicyt.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Sergipe (CEP-UFS), e está registrado com o número CAAE **56276116.10000.5546**.

RESULTADOS

Foram avaliadas três amostras de sangue periférico, sendo uma de paciente homocigoto para HbS e outra de heterocigoto (HbAS), as quais foram comparadas com amostra de indivíduo saudável (HbAA).

O primeiro tubo avaliou o perfil de linfócitos T auxiliar (CD4) e linfócitos T citotóxico (CD8) e foram observados os seguintes resultados (Figura 1 e 2):

- 1) Paciente SS: 22,0% de linfócitos T auxiliares, 19,7% de linfócitos T citotóxicos;
- 2) Paciente AS: 39,4% de linfócitos T auxiliares e 22,9% de linfócitos T citotóxicos.
- 3) Controle (AA): 33,6% e 29,8% de linfócitos T auxiliares e citotóxicos, respectivamente.

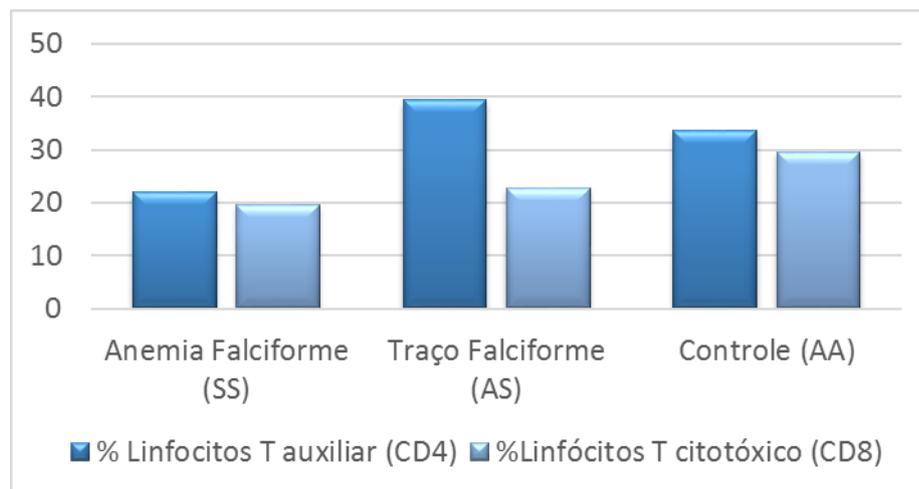


Figura 1: Percentual de subtipos de linfócitos T em paciente portador de anemia falciforme, em indivíduo portador de traço falciforme, e em indivíduos controle.

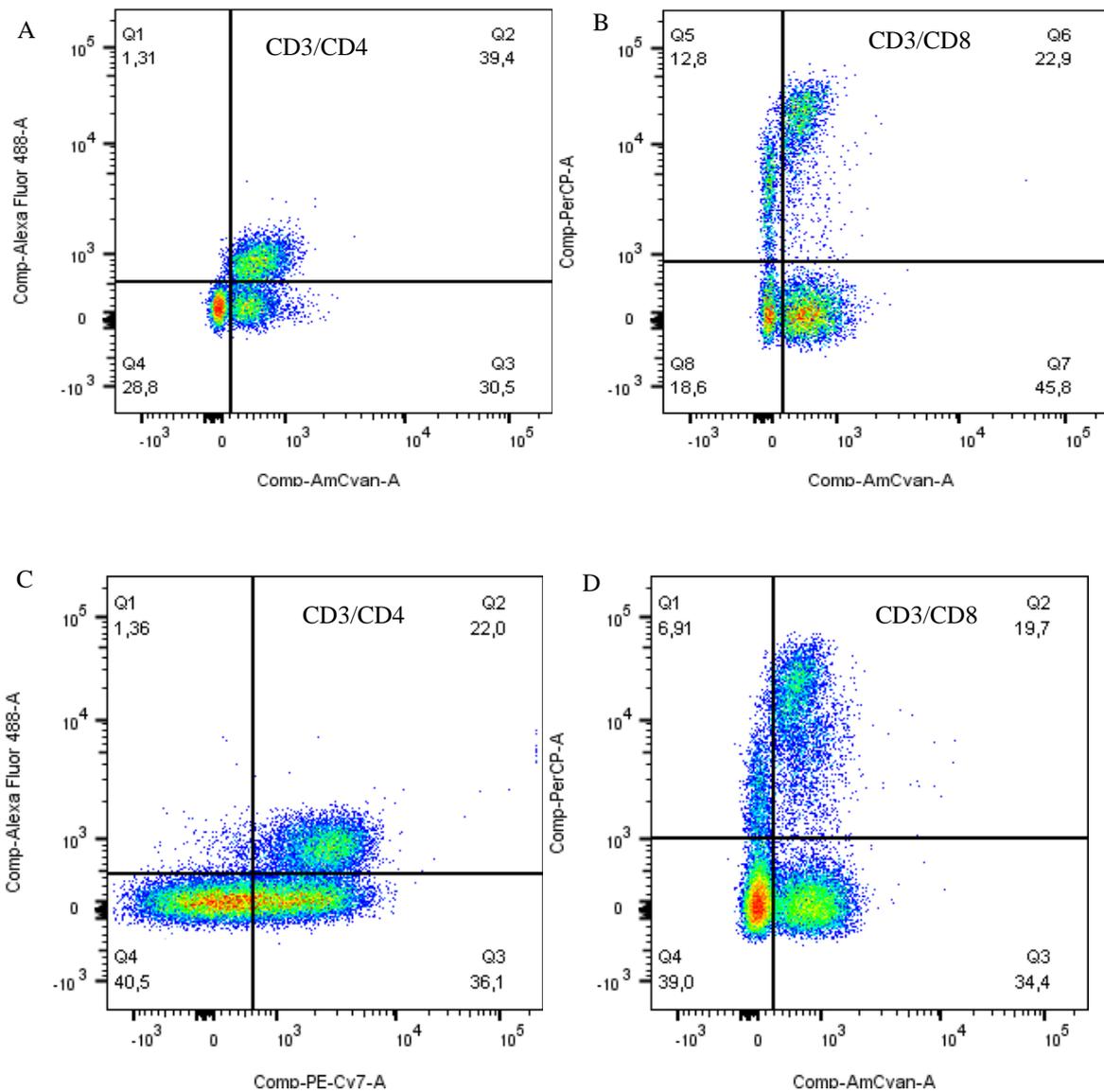


Figura 2: Histograma da análises dos subtipos de linfócitos. A: Linfócitos T CD3+/CD4+ em indivíduo portador de traço falciforme. B: Linfócitos T CD3+/CD8+ em indivíduo portador de traço falciforme. C: Linfócitos T CD3+/CD4+ em portador de Anemia Falciforme. D: Linfócitos T CD3+/CD8+ portador de Anemia Falciforme.

Os resultados seguintes representam as porcentagens de linfócitos T que marcaram positivamente para IL2, INF γ e TNF α :

- 1) Paciente SS: 0,75%, 0,14% e 0,34%
- 2) Paciente AS: 1,66%, zero, 0,32%
- 3) Controle AA: 2,28%, 0,013%, 0,013%.

O segundo tubo avaliou a presença de linfócitos T reguladores, e não houve grande percentual destas células em nenhuma das amostras, bem como não houve diferença considerável dos valores das mesmas quando comparadas.

O terceiro tubo avaliou a presença de células NK e as porcentagens de células que marcaram positivamente para CD3 nas três amostras estudadas, são (Figura 3):

- 1) Paciente SS: 2,9%
- 2) Paciente AS: 0,60%
- 3) Controle AA: 0,004%

Conforme se observa nos quadrantes Q3 e Q4 da Figura 3, a proporção de células NK CD3- foi maior nos pacientes SS e AS, sendo mínima na amostra do controle AA.

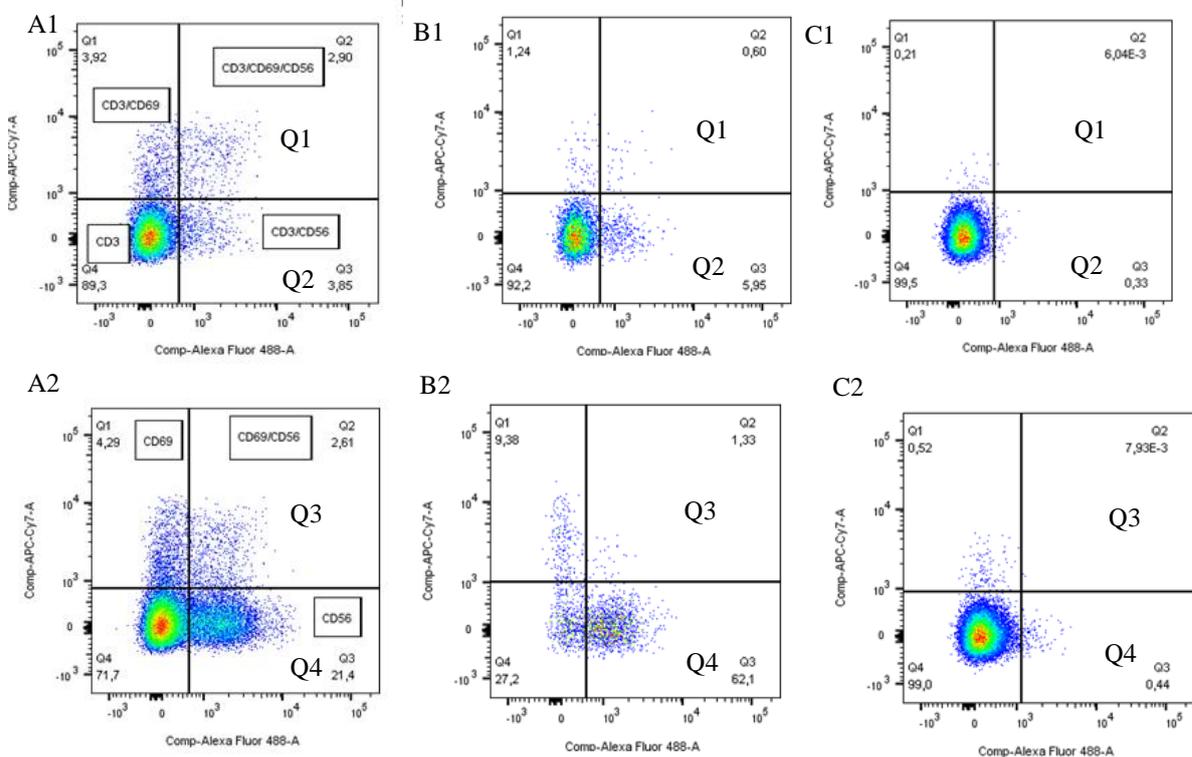


Figura 3: Histograma da análise dos subtipos de células NK. A1/2: Perfil de células NK em portadores de anemia falciforme. B1/2: Perfil de células NK em indivíduos portadores de traço falciforme. C1/2 Perfil de células NK nos controles. Q1: quadrante referente a células NK CD3+/CD69+/CD56+. Q2: quadrante referente as células NK CD3+/CD69-/CD56+. Q3: quadrante referente as células NK CD3-/CD69+/CD56+. Q4: quadrante referente a células NK CD3-/CD69-/CD56+.

DISCUSSÃO

O entendimento completo da fisiopatologia das doenças falciformes, e em especial da AF, é um desafio desde sua descrição em 1910. Hemólise foi sua característica mais evidente, e, juntamente com a decorrente anemia, explicam apenas parcialmente a vasta gama de sintomas apresentados pelos pacientes.

Ao longo das primeiras décadas que se seguiram à sua descrição, limitada pela sobrevida modesta dos seus portadores, aparentemente a anemia hemolítica parecia ser, ao lado das infecções e dos episódios de dor aguda, os sintomas que deveriam ser combatidos. Entretanto, com um melhor controle das infecções e melhor qualidade e disponibilidade de hemocomponentes, a sobrevida progressivamente aumentou, e as consequências do dano crônico aos diversos órgãos e sistemas passaram a limitar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes a partir da segunda década de vida.

Paralelamente a essas observações, tornou-se também evidente que a intensidade das manifestações clínicas, tanto agudas quanto crônicas, era muito variada. Assim, a procura de biomarcadores que pudessem identificar precocemente pacientes que iriam evoluir desfavoravelmente orientou muitas pesquisas, que incluíram a quantificação de marcadores de resposta inflamatória durante as crises álgicas e nos períodos intercríticos. Os resultados indicaram que a AF evolui como doença inflamatória crônica, decorrente das lesões de isquemia-reperusão.

Cada novo episódio de isquemia-reperusão desencadeia a cascata inflamatória, iniciada pela ativação de células T e NK, concedendo a essas células papel importante na fisiopatologia da AF, tornando-as assim alvo de estudos para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento da AF [4, 6].

Os resultados obtidos no estudo foram concordantes com dados encontrados na literatura no que se refere à comparação entre a contagem da população de células NK (independente da subpopulação) em pacientes com AF e indivíduos controle [7, 8]. O indivíduo com AF apresentou maior porcentagem de células NK em relação ao indivíduo com traço falciforme, e estes último em relação a indivíduo controle. Os resultados então sugeriram um gradiente de distribuição de células NK nas três amostras, tendo o indivíduo com AF e o controle a maior e menor contagem destas células, respectivamente, apresentando o heterozigoto AS valor intermediário. Permite, portanto, a ratificação da existência de estado inflamatório crônico em pacientes em estacionários (fora de crise).

Em relação a contagem de linfócitos T CD8 positivo, os resultados divergem com os relatos encontrados na literatura, que afirmam haver um nível global maior dos mesmos em pacientes com AF comparado a indivíduos controle. Evidência semelhante foi encontrada nos resultados da contagem da subpopulação dos linfócitos T citotóxicos [5].

CONCLUSÃO

Os resultados relativos as células NK se mostraram significativos, e são necessários estudos específicos em humanos onde sejam dosados marcadores de citotoxicidade como perforina e granzima, e discriminadas as subpopulações de células NK, principalmente a forma não invariante (não NKT), visto que a literatura dispõe em sua maioria de estudos aplicados em animais. Além do mais, os resultados apresentados no presente estudo se mostram preliminares, e deverão ser confirmados em amostra adequada. São, contudo, promissores no sentido de identificar-se alvos terapêuticos e, principalmente, estratégias para prevenção de danos crônicos a órgãos, visando retardar as complicações crônicas da AF e assim permitir que os pacientes elegíveis estejam em boas condições clínicas para submeter-se a um transplante de células tronco-hematopoiéticas, única modalidade terapêutica definitiva disponível até o momento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Orah SP. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *The Journ of Clin Investig.* 2000; 106 (3): 337-338.
2. 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.
3. Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza, AWS, Cruvinel WDM, Andrade LEC, Silva NPD. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras de Reumat.* 2010; 50 (5): 337-338.
4. Wallace KL, Marshall MA, Ramos SI, Lannigan JA, Field JJ, Strieter RM, *et al.* 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.
5. Koffi KG, Sawadogo D, Meite M, Nanho DC, Tanoh ES, Attia AK, *et al.* Reduced levels of T-cell subsets CD4+ and CD8+ in homozygous sickle cell anaemia patients with splenic defects. *The Hematol Journal.* 2003; 4 (5): 363-365.
6. Oswaldo C, Donald JB, Bruce T, Carl AR, Roland BS, Peter G, *et al.* The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. *The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Blood,* 1994; 84 (2): 643-649.
7. 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.
8. Field JJ, Nathan DG, Linden J. Targeting iNKT cells for the treatment of sickle cell disease. *Clinical Immunology.* 2011; 140 (2): 177-183.

IV. ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, pesquisadores da Universidade Federal de Sergipe, pedimos sua autorização para sua participação na pesquisa: **“Perfil de linfócitos T e células NK em pacientes com anemia 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 incômodo 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

Dra Rosana: 79-99981-1238

Diante do que foi dito, confirmo a minha participação:

Assinatura

Aracaju, ____ de _____ de 20 ____

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.

Aracaju, __/__/____

Pesquisador responsável