



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PRISCILA OLIVEIRA PERCOUT

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LINFÓCITOS T E CÉLULAS NK NA ANEMIA
FALCIFORME**

ARACAJU

2017

PRISCILA OLIVEIRA PERCOUT

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LINFÓCITOS T E CÉLULAS NK NA ANEMIA
FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Cipolotti

ARACAJU

2017

PRISCILA OLIVEIRA PERCOUT

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LINFÓCITOS T E CÉLULAS NK NA ANEMIA
FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em ____/____/____

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Cipolotti

1º Examinador: Prof. Dr. Ivison Xavier Duarte

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Tatiana Rodrigues de Moura

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 “Obrigada! ”.

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, paciente e dedicada a seus alunos.

Sou grata a Professora Cristiane Bani, 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, Tatiana, e em especial a doutoranda Aline, a qual esteve ao meu lado todo tempo e teve a maior paciência de compartilhar todos os seus conhecimentos. Agradeço também aos colegas Lucas, Lays e Betânia.

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

RESUMO

Avaliação do perfil de linfócitos T e células NK na Anemia Falciforme. Priscila Oliveira Percout. 2017

INTRODUÇÃO: A anemia falciforme (AF) é uma das desordens genéticas mais comuns do mundo. Entretanto, até pouco tempo atrás, apenas as consequências diretas da polimerização da desoxiHbS explicava a fisiopatogenia da doença. Atualmente, sabe-se que as repercussões clínicas da AF envolvem interações complexas entre o eritrócito, endotélio e leucócitos: citocinas secretadas por células inflamatórias estão envolvidas nas crises e na manutenção de um *status* inflamatório sistêmico, o que sugere que as células T (auxiliares e citotóxicas) e NK têm papel fundamental nos fenômenos clínicos da AF. Este estudo visa avaliar o perfil de linfócitos T e NK em portadores de AF e comparar com o perfil de indivíduos com traço falciforme e indivíduos sem hemoglobinopatias. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foi coletado sangue periférico de 17 indivíduos; 7 com hemoglobinopatia SS (grupo SS), 5 com traço falciforme (grupo AS) e 5 normais (grupo AA). Todos confirmados por eletroforese de hemoglobina. Amostras de pacientes hemotransfundidos 30 dias antes ou em uso de antiinflamatórios 2 dias antes da coleta foram excluídas. O isolamento dos linfócitos para análise foi realizado utilizando solução de Ficoll-Hypaque. A imunofenotipagem para determinação dos subtipos linfocitários foi realizada por citometria de fluxo, utilizando citômetro de oito cores e oito anticorpos da BD Biosciences®. Os dados foram analisados com auxílio do software Flowjo e tabulados no SPSS IBM 22.0. Os resultados referentes às variáveis numéricas foram expressos através de medidas de tendência central: média e valores mínimos e máximos. **RESULTADOS:** Globalmente foi observada menor frequência de linfócitos T e maior frequência de células NK nos pacientes falcêmicos, com média de 31,2% de TCD4+ contra 43,47% do grupo AS e 45,37% do grupo AA. Para os linfócitos TCD8+, o grupo SS obteve média de 12,64% contra 17,1% do AS e 16,42% do AA. A variação de TCD4+ encontrada entre os pacientes AF e o grupo AA foi significativa ($p=0,04$). Tendência de menor frequência em pacientes do grupo SS se manteve para os linfócitos B. Foi observada maior frequência de células NK em pacientes portadores de anemia falciforme (média do grupo AA=8,83%; AS=11,2% e grupo SS=19,6%), respectivamente, com diferença significativa entre o grupo AA e o grupo SS ($p=0,040$). **CONCLUSÃO:** Portadores de AF apresentam tendência de menor frequência de linfócitos T, com diferença significativamente menor comparado ao portador de traço e o paciente portador de AF, para linfócitos T CD4+ verificou-se redução significativa deste subtipo celular entre grupo SS e AA. Neste estudo também foi evidenciado uma frequência crescente e progressiva de células NK entre os grupos AA, AS e SS. Acreditamos que mais estudos são necessários visando compreender o papel destas células na gênese da inflamação sistêmica da AF. Este entendimento possivelmente contribuirá para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

DESCRITORES: Anemia falciforme, subpopulações de linfócitos, linfócito T, citometria de fluxo.

ABSTRACT

Evaluation of the T-lymphocyte and NK cells profile in Sickle Cell Anemia. 2017. Priscila Oliveira Percout.

Introduction: Sickle cell anemia (SCA) is one of the most common genetic disorders in the world. However, until recently, only the direct consequences of the deoxyHbS polymerization was used to explain the pathophysiology of the disease. Currently, it is known that the clinical repercussions of FA involve complex interactions between the erythrocyte, endothelium and leukocytes: cytokines secreted by inflammatory cells are involved in SCA crisis and in the maintenance of a systemic inflammatory status, suggesting that T cells (Helpers and Cytotoxics) and NK have a fundamental role in the clinical phenomena of SCA. This study aims to evaluate the profile of T and NK lymphocytes in patients with AF and compare them with the profile of individuals with sickle cell trait and individuals without hemoglobinopathies. **Materials and methods:** Peripheral blood was collected from 13 individuals; 7 with SS hemoglobinopathy (SS group), 5 with sickle cell trait (AS group) and 5 normal (AA group). The lymphocytes isolation for analysis was performed using Ficoll-Hypaque solution. Immunophenotyping for the determination of lymphocyte subtypes was performed by flow cytometry, using eight-color cytometer and eight BD Biosciences® antibodies. Data were analyzed using Flowjo software and tabulated in SPSS IBM 22.0. The results referring to the numerical variables were expressed through measures of central tendency. **Results:** A lower frequency of T lymphocytes and a greater frequency of NK cells were observed in sickle cell patients. The variation of TCD4 + found between the SCA and the AA group was significant ($p = 0.04$). Lower frequency tendency in patients of the SS group remained for B lymphocytes. A higher frequency of NK cells was observed in patients with sickle cell anemia (mean: group AA = 15.63%, group AS = 14.82% and group SS = 23.34%) with statistically significant variation. **Conclusion:** SCA patients present a lower frequency of CD4 + CD8 + T cells and TNK cells when compared with HbAS individuals and individuals without hemoglobinopathies. An increasing and progressive frequency of NK cells is observed between groups AA, AS and SS. We believe that further studies are needed to understand the role of these cells in the genesis of systemic inflammation of SCA. This understanding may contribute to the development of new therapeutic strategies.

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

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

Figura 1 - Bases fundamentais do curso clínico da anemia falciforme

ARTIGO:

Figura 1 - Histograma com estratégia de análise dos subtipos de linfócitos B e linfócitos T (CD4 e CD8).

Figura 2 - Histograma com estratégia de análise dos subtipos de células NK

Figura 3- Proporção de subpopulações de linfócitos B (CD19+) e linfócitos T (CD3+), em termos percentuais, nos grupos de pacientes AA, AS e SS respectivamente.

Figura 4- Proporção de subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8, em termos percentuais, nos grupos de pacientes AA, AS e SS respectivamente.

Figura 5- Proporção de células NK totais, em termos percentuais, nos grupos AA, AS e SS respectivamente.

Figura 6- Proporção de linfócitos NKT (CD3+/CD56+/CD16-) e células NK (CD3+CD56+/CD16+ e CD3-/CD56+/CD16-), em termos percentuais, nos grupos AA, AS e SS respectivamente

:

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia Falciforme
A2aR	Receptor A2a de Adenosina
ASC	<i>Aapoptosis-associated Speck-like protein containing C-terminal caspase recruitment domain</i>
AMP	Adenosina Mono-Fosfato
ATP	Adenosina Tri-Fosfato
BCAM/Lu	Molécula de adesão celular/Lutheran
°C	Graus Celsius
C3a	Fração 3a do sistema complemento
C3b	Fração 3b do sistema complemento
C4a	Fração 4a do sistema complemento
C5a	Fração 5a do sistema complemento
CARD	<i>Caspase Activation and Recruitment Domain</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
DF	Doença Falciforme
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> (Padrões moleculares associados ao dano)
ET-1	Endotelina-1
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FT	Fator Tecidual
HbA	Hemoglobina A
HbF	Hemoglobina F (Hemoglobina Fetal)
HbS	Hemoglobina S
HbAS	Hemoglobina AS (Traço falciforme)
Hsp	<i>Heat Shock Protein</i>
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IR	Isquemia-Reperfusão
MHC	<i>Main Histocompatibility Complex</i>
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Hidrogenado
NET	Traves extracelulares de neutrófilos
NFκB	Fator de transcrição nuclear fator κB
NK	<i>Natural Killer</i> (Assassinas naturais)
NKT	Células T assassinas naturais
NLRP3	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3</i>
NO	<i>Nitric Oxid</i> (Óxido nítrico)
NOD	<i>Nucleotide oligomerazation domain</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>

PBS	Tampão Fosfato Salino
PHHF	Persistência hereditária da hemoglobina fetal
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute sintetic culture solution</i>
rpm	Rotações por minuto
SSC	<i>Side Scatter</i>
TCR	<i>T cells receptor</i> (Receptor de células T)
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TH	<i>T Helper</i> (T auxiliar)
TNF-α	<i>Tumoral Necrosis Factor</i> (Fator de necrose tumoral α)
UFS	Universidade Federal de Sergipe
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	27
4. ARTIGO.....	33
4.1 INTRODUÇÃO.....	34
4.2 MATERIAIS E METÓDOS.....	35
4.3 RESULTADOS.....	38
4.4 DISCUSSÃO.....	40
4.5 CONCLUSÃO	42
4.6 AGRADECIMENTOS.....	42
4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
4.8 FIGURAS E QUADROS	44
5.APÊNDICES.....	48

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 da doença 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 portadores de S/ β^+ -talassemia, quando há ainda certa quantidade de HbA. Uma exceção a 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 que, ao se desoxigenar, torna-se rígida e em forma de foice, com flexibilidade reduzida, fato que dificulta sua passagem através da microcirculação. O aumento da viscosidade sanguínea associado à redução da deformabilidade dos eritrócitos leva à formação de microtrombos, causando obstrução vascular, responsável por crises algicas 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 algica, associada à isquemia tecidual aguda causada pela vasclusão, responsável por dor importante, necessitando frequentemente de internação e analgesia com opioides. Desidratação, mudanças de temperatura, estresse, acidose e infecção funcionam como fatores desencadeantes dessas crises (SCHNOG *et al*, 2004; VICHINSKY *et al*, 2005).

Crises repetidas estão relacionadas 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 lesões orgânicas agudas e crônicas que podem estar presentes nos portadores de AF. (MARTINS *et al*, 1998; BANDEIRA *et al*, 1999; LOUREIRO *et al*, 2005; ALMEIDA *et al*, 2008).

Neste contexto, dada a gama de complicações que podem decorrer desta doença, é possível afirmar que a visão clássica da AF como uma doença genética caracterizada por uma mutação primária que resulta na polimerização da HbS e formação de eritrócitos afoiçados capazes de promoverem a obstrução do fluxo sanguíneo causando sofrimento aos tecidos, de forma aguda e cronicamente, é assaz incompleta para uma doença com espectro bastante amplo de lesões sistêmicas.

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-reperusão (IR) promovendo alteração na estrutura de sua membrana que gera um dano endotélial 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. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 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 à mera presença de um 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 aos antígenos (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 microrganismos 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 inata 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 para a drenagem local linfonodo, onde eles apresentam antígeno para 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 moléculas 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 inato na proteção contra células infectadas e células malignas. Eles reconhecem seus alvos de duas maneiras, como muitas outras células, possuem receptores que se ligam a fração Fc da Imunoglobulina G (IgG). Estes receptores ligam as células NK às 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, que são conhecidas como moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) de 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 interage 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 dependem 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 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).

2.2 Fisiopatologia da Anemia Falciforme: hemólise X vasoclusão

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).

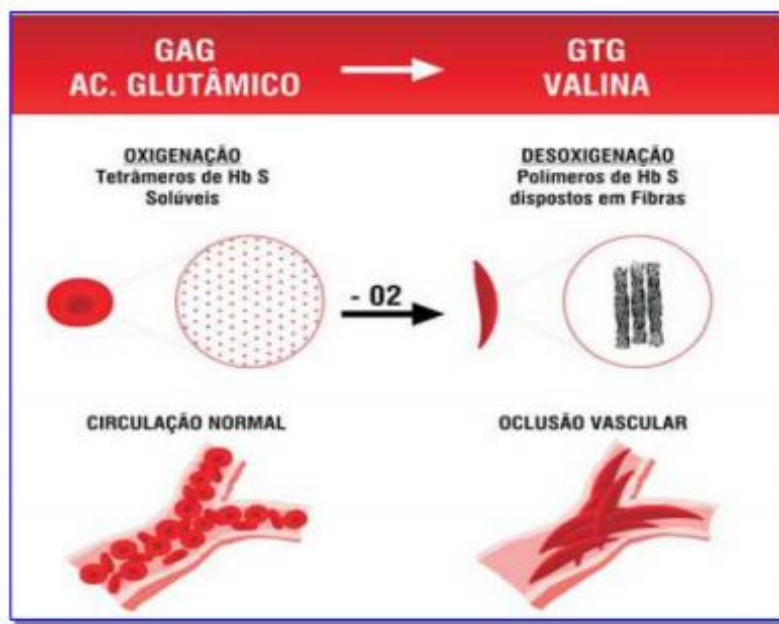


Figura 1: Bases fundamentais do curso clínico da anemia falciforme. A mutação genética que promove a troca do ácido glutâmico pela valina promove a geração da HbS, uma hemoglobina que quando desoxigenada promove a formação de polímeros insolúveis, que transforma o eritrócito numa célula rígida que é capaz de promover obstrução de fluxo sanguíneo na microcirculação (vasoclusão). Adaptado de Lobo *et al* 2007.

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 para o desenvolvimento de fenômenos vasoclusivos e anemia hemolítica, respectivamente (CONRAN *et al*, 2009).

O fenômeno de vasoclusão compreende um processo com várias etapas que envolvem interações entre eritrócitos falciformes, leucócitos ativadas, 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 (CHANG & 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 participar da vasoclusão o eritrócito em foice sofre 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 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. Em nível molecular estão presentes a mutação do gene da hemoglobina e sua polimerização intra-hemácia quando desoxigenada; em nível celular são

marcantes as alterações de membrana, a facização dos eritrócitos e a sua adesão celular ao endotélio; no nível tecidual observam-se hipóxia local, isquemia, inflamação, lesão microvascular, ativação da coagulação e depleção de óxido nítrico (NO); e, por fim, todas estas alterações traduzem-se em manifestações clínicas, as quais se apresentam como síndromes dolorosas e insuficiência de múltiplos órgãos (ZAGO & PINTO, 2007).

2.3 Hemólise: uma 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 “estéril” (MENDONÇA *et al*, 2016).

O heme, importante componente da hemoglobina, é uma molécula 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 multiproteico 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 (ROS) 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 e há relatos que apontam que não somente a lise mas também quando os eritrócitos estão sujeitos a hipóxia, bem como no estresse oxidativo ATP pode ser liberado, 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 à 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 inflamossomas, 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 priapismo, 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).

2.4 Vasoclusão, hemólise, lesão endotelial e adesão celular

2.4.1 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 eritroides 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 observada 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 (ROS) 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).

2.4.2 Vasocclusão, 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 α 4 β 1), a CD36 e a molécula de adesão celular/Lutheran (BCAM/Lu), proteína produzida pelo gene do grupo 22-superoxido Lutheran. A integrina VLA-4 (integrina α 4 β 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).

2.4.3 Vasocclusão, hemólise e o leucócito

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 vasocclusão, 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 vasocclusivos (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. A doença está relacionada à hemólise e liberação de heme. 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).

2.4.4 Vasocclusão, hemólise e a 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 com Wilebrand 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 aumentar 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).

2.4.5 Vasoclusão, hemólise, óxido nítrico e o estress 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 espécies reativas de oxigênio (ROS), 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 à 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. ROS 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 ROS, 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 ROS na fase final da lesão pós-reperusão (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 antioxição malsucedida (CHIRICO & PIALOUX, 2012; OS 3; MOHANTY *et al*, 2014).

2.4.6 Vasoclusão, hemólise, linfócito T e células NK

Modelos animais (camundongos) de vasoclusão com células falciformes forneceram evidências preliminares de que a lesão de isquemia-reperusão (IR) contribui para um ambiente pró-inflamatório causando ativação de leucócitos, migração e adesão, sustentando e

propagando a vasocclusão iniciada por eritrócitos em forma de foice. Embora o mecanismo IR em vasocclusão 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).

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 e colaboradores (2009) compararam os pulmões de camundongos do tipo selvagem e camundongos AF. As células T NK pulmonares dos animais AF são aumentados em número e ativados 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).

3. 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.

APPAY, V. The physiological role of cytotoxic CD4+ T-cells: the holy grail?. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 138, n. 1, p. 10-13, 2004.

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.

BLOMM, Bianca; SPITS, Hergen. Development of human lymphoid cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 287-320, 2006.

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.

DAHMANI, Fatima et al. Evaluation of hemogram in patients with homozygous sickle cell disease: about 87 cases. **The Pan African Medical Journal**, v. 25, p. 240-240, 2016.

- 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.G et al. Reduced levels of T-cell subsets CD4p and CD8p in homozygous sickle cell anemia, patients with splenic defects. **The Hematology Journal**, v. 4, 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.

ONYEMELUKWE, G. C.; MUSA, B. O. T-lymphocyte subsets in patients with hookworm infection in Zaria, Nigeria. **African journal of medicine and medical sciences**, v. 30, n. 4, p. 255-259, 2001.

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.

QUINN, Charles T. et al. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell anemia: a study of the Dallas Newborn Cohort. **Blood**, v. 111, n. 2, p. 544-548, 2008.

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.

SILVA, Sônia Leite *et al.* Um novo modelo de isolamento do tumor de Walker utilizando o gradiente de Ficoll-Hypaque. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 101-105, Apr. 2006.

SINGHAL, Rashi et al. Development of pro-inflammatory phenotype in monocytes after engulfing Hb-activated platelets in hemolytic disorders. **Clinical Immunology**, v. 175, p. 133-142, 2017.

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.

TASSEL, Clément et al. Leukocytosis is a risk factor for lung function deterioration in children with sickle cell disease. **Respiratory medicine**, v. 105, n. 5, p. 788-795, 2011.

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.

4. ARTIGO (versão em português):

Abaixo segue artigo que foi submetido ao periódico *Seminars in Hematology*:

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LINFÓCITOS T E CÉLULAS NK NA ANEMIA FALCIFORME

Autores:

Priscila Oliveira Percout

Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe

Guilherme Fernandes Ramos da Silva

Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe

Oswaldo Alves de Menezes Neto

Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe

Thiago Piloto de Andrade

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

4.1 INTRODUÇÃO

Caracterizada molecularmente pela substituição do ácido glutâmico pela valina no codón 6 do gene da globina β , a anemia falciforme (AF) é uma das desordens genéticas mais comuns do mundo. Essa mutação, quando em homozigose, implica na polimerização das moléculas de desoxi-hemoglobina, causando redução da solubilidade da hemoglobina que, por sua vez, repercute clinicamente como uma síndrome complexa que gera hemólise, vaso-oclusão e um *status* inflamatório sistêmico^[1].

Há até pouco tempo atrás a hematologia concentrou-se apenas no defeito genético primário, a polimerização da HbS e suas consequências diretas, para explicar o modelo clássico da fisiopatogenia da AF: o eritrócito falcizado obstrui o fluxo sanguíneo causando sofrimento isquêmico agudo aos tecidos e, cronicamente, levando à baixa saturação de oxigênio e má perfusão. Entretanto, hoje é sabido que as hemácias anormais apresentam alterações estruturais na membrana que, além de obstruírem a microcirculação, provocam lesão endotelial. O dano contínuo desencadeia uma resposta inflamatória sistêmica que se reflete na liberação de interleucinas e expressão de moléculas de adesão que promovem a agregação e recrutamento de leucócitos, amplificando a inflamação sistêmica e causando repercussões clínicas^[2].

Atualmente já se compreende que as repercussões clínicas, e mesmo o fenômeno de vaso-oclusão, envolvem interações complexas entre o eritrócito, o endotélio e leucócitos: as citocinas secretadas pelas células T e a expressão de moléculas de adesão estão envolvidas na iniciação e desenvolvimento da crise de vaso-oclusão^[3]. Em modelos animais já se observou que a lesão de isquemia-reperfusão da anemia falciforme promove elevação de citocinas associadas à atividade de células NK no baço, fígado e pulmão^[4]. Deste modo, acredita-se que as células T auxiliares, T citotóxicas e NK são fundamentais nos fenômenos clínicos da AF.

Nesta direção, este estudo tem por objetivo avaliar o perfil de linfócitos T (auxiliar e citotóxico) e NK em pacientes portadores de anemia falciforme, mensurando a frequência de linfócitos T auxiliar, T citotóxico e células NK, comparando, posteriormente, com a frequência destas mesmas células inflamatórias em indivíduos com traço falciforme e indivíduos sem quaisquer hemoglobinopatia. Acredita-se, portanto, que a compreensão do papel de cada linhagem de linfócitos T e NK, na gênese do *status* inflamatório sistêmico do

paciente com AF, contribuirá para o entendimento da fisiopatologia da doença, possibilitando, num futuro breve, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

População, amostra e local do estudo

A coleta das amostras ocorreu no período entre dezembro de 2016 a junho de 2017. Foram coletadas amostras de sangue periférico de 17 indivíduos para as análises. Dentre os participantes, 7 eram portadores de Anemia Falciforme (grupo SS), 5 eram portadores de traço falciforme (grupo AS) e 5 indivíduos não possuíam quaisquer hemoglobinopatias (grupo AA); 9 (52,9%) eram do sexo feminino e 8 (47,1%) do sexo masculino; a média de idade dos indivíduos foi de 30,8 anos ($20-39 \pm 5,43$).

Os pacientes foram recrutados a partir da demanda espontânea do serviço ambulatorial na Universidade Federal de Sergipe (UFS), referência regional para tratamento de Doença Falciforme (DF) no Estado de Sergipe. Pacientes homozigotos para hemoglobinopatia S (SS) foram convidados para compor o grupo SS. Familiares de primeiro grau (pai, mãe e irmãos) dos pacientes falcêmicos foram convidados para compor o grupo AS (traço falciforme). O grupo controle (grupo AA) foi recrutado a partir da população de estudantes de graduação e pós-graduação da Faculdade de Medicina da UFS. Todos os participantes autorizaram explicitamente a sua participação na pesquisa através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). 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.

Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos na população estudada: pacientes portadores de anemia falciforme e fenótipo SS, confirmado por eletroforese de hemoglobina (grupo SS); indivíduos portadores de traço falciforme, fenótico A1S, confirmado por eletroforese de hemoglobina; indivíduos sem quaisquer hemoglobinopatias, com fenótipo A1A2, confirmado por eletroforese de hemoglobina. Foram incluídos apenas pacientes com mais de 18 anos de idade.

Foram excluídos da pesquisa, pacientes falcêmicos com histórico de crise algica, infecção e internação nas últimas quatro semanas que precederam a coleta; quaisquer indivíduos com histórico de transfusão sanguínea nos últimos 120 dias que antecederam a

coleta; pacientes falcêmicos em uso de hidroxiuréia para o tratamento da AF; e, quaisquer pacientes com histórico de uso de anti-inflamatórios nas últimas 24 horas antes da coleta.

Descrição da técnica empregada para o isolamento dos subtipos de linfócitos

Para a determinação dos subtipos de linfócitos T e células NK foi coletado sangue periférico dos indivíduos estudados, seguido de isolamento de células mononucleares de sangue periférico. A imunofenotipagem para determinação dos subtipos de linfócitos foi realizada a partir de citometria de fluxo. Foi utilizado citômetro de 8 cores e anticorpos da BD Biosciences®.

Inicialmente foram coletados, em tubo heparinizado, 15 ml de sangue periférico de cada participante. Ao sangue coletado adicionou-se solução salina e se prosseguiu com o processo de isolamento de células mononucleares. O processo de isolamento dos linfócitos foi iniciado com a centrifugação da amostra em solução de Ficoll-Hypaque, em seguida, lavando-se por duas vezes a amostra, com solução salina. Esta técnica é conhecida como *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC). Quantidades fixas de linfócitos (1×10^6 células) foram dispostas em placas com 48 poços juntamente com o meio de cultura RPMI. Posteriormente, as placas foram colocadas em estufa de monóxido de carbono, para preservação das células.

Após a preparação das placas, para marcação de anticorpos de superfície as mesmas foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos a 4° C, lavadas com solução tampão fosfato salino (PBS) e bloqueadas com solução contendo 2% de soro fetal bovino. Somente após isso, as células receberam marcação para os oito seguintes anticorpos de superfície: CD3; CD4; CD8; CD14; C19; CD56; CD16 e CD69. O painel utilizado para avaliação de linfócitos B e linfócitos T (CD4 e CD8), continha os seguintes anticorpos anti-humanos: CD3PECy7; CD4FITC, CD8PEcy5; CD14PE e CD19APCy7. Já para a identificação de células NK os seguintes anticorpos anti-humanos eram utilizados: CD3PEcy7; CD16APC, CD56BV421 e CD69APCy7.

Após a adição dos marcadores dos anticorpos de superfície, as células foram novamente incubadas por 30 minutos e nova lavagem com PBS foi realizada, com centrifugação a 1500 rpm, a 4° C por 5 minutos. Em seguida, visando diferenciar as células vivas das mortas e/ou de fragmentos celulares, foi realizada marcação com anticorpo anti-humano Live/Dead AmCyan. Nova incubação de 30 minutos foi realizada, seguida de nova lavagem com PBS, a fim de eliminar células e fragmentos não-vivos. Por fim, as células

foram resuspensas em 300 μ L de PBS e então colocadas no citômetro de oito cores FCASCanto II da BD Biosciences® para análise e imunofenotipagem.

Estratégia de análise das células a partir da imunofenotipagem

A seleção de gates para análise dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foi iniciada a partir do tamanho relativo celular (FSC) cruzada com anticorpos Live/dead AmCyan, o que isolou uma janela cuja população consistia de pequenas células que apresentavam marcadores para células vivas (Figura 2-A). Posteriormente, as células isoladas por FSC foram analisadas segundo a sua granularidade (SSC), com gate na região células de menor granularidade – linfócitos (Figura 2-B).

Os linfócitos, então, foram analisados segundo os antígenos de superfície que apresentavam: a análise de FSC por marcadores PEcy7 e APCy7 isolaram populações de pequeno tamanho e que expressaram, respectivamente, CD3⁺ (Figura 2-D) ou CD19⁺ (Figura 2-C) em sua superfície. Por fim, as células isoladas pelo gate para CD3⁺ foram analisadas para CD4 FITC (Canal Alexia) por CD8 PEcy5 (Canal PerCP), diferenciando quatro subtipos celulares. Aquelas células presentes no quadrante Q1 são Linfócitos T CD4⁺ e no quadrante Q3, Linfócitos T CD8⁺ (Figura 2-E).

Para análise das células NK e suas subpopulações as duas etapas iniciais da análise anterior foram seguidas: análise de FSC com anticorpos Live/dead AmCyan, isolando células vivas (Figura 3-A), posteriormente analisadas por FSC com SSC exibindo gate para linfócitos (Figura 3-B). Após o isolamento do gate para linfócitos vivos, marcadores de superfície para células NK foram estudados. Prosseguiu-se a análise por FSC com CD3 PEcy7, exibindo gate para células CD3⁺ (Figura 3-C); por FSC e CD56 BV421, exibindo gate para células CD56⁺ (Figura 3-D); por FSC e CD16 APC, com gate para células CD16⁺ (Figura 3-E); e, por FSC com CD69 APCy7 com gate para células CD69⁺ (Figura 3-F).

Expô-se, no quadro 1, uma análise dos fenótipos celulares possíveis a partir da combinação dos marcadores de superfície CD3, CD16, CD56 e CD69. Apenas as células com combinação de marcadores CD3⁺, CD56⁺, CD16⁺ e CD69⁻ (células NKT *naive*), CD3⁻, CD56⁺, CD16⁺ e CD69⁻ (células NK comprometidas) e CD3⁻, CD56⁺, CD16⁻ e CD69⁺ (células NK maduras) foram estudadas.

Análise dos Dados

A análise dos subtipos de linfócitos e células NK foi realizada no software Flowjo. Os dados coletados foram tabulados no programa SPSS IBM 22.0 e os resultados referentes às variáveis numéricas foram expressos através de medidas de tendência central: média e valores mínimos e máximos. Para análise de distribuição das variáveis foi utilizado o teste D'Agostino & Pearson, observou-se que nenhuma das variáveis tinham distribuição normal. A comparação das médias entre os diferentes grupos foi realizada a partir do seguinte teste não paramétrico: Mann-Whitney.

4.3 RESULTADOS

A AF é uma doença que, de forma geral, em sua etiologia ocorre um processo inflamatório crônico, por isso foi optado pela avaliação dos diferentes tipos de linfócitos nestes pacientes, células atuantes de forma direta ou indireta na resposta imunológica adaptativa, com ação citotóxica direta ou atuando na regulação desta.

Durante o processo de maturação da série linfóide, as diferentes classes de linfócitos adquirem proteínas conhecidas como cluster de diferenciação- os CDs, por isso na avaliação dos linfócitos B, foi utilizado CD19, uma proteína de superfície que está presente nos linfócitos B desde células progenitoras (linfócitos pré-B). Na análise deste subtipo celular foi observado uma tendência a uma frequência menor destas células nos pacientes SS (AA=5,03% \pm 0,81; AS=5,97% \pm 2,45; SS=3,07% \pm 3,19), conforme figura 3, apesar desta diferença não ser significativa entre os grupos.

Já na diferenciação dos linfócitos T, nos observamos a presença do CD3, esta proteína está relacionada a presença do receptor TCR na superfície destas células. Na amostra foi evidenciado uma menor frequência de linfócitos T (CD3+) no grupo dos pacientes portadores de AF (AA=68% \pm 7,44; AS=69,3% \pm 4,45; SS=52,5% \pm 14,90), sendo esta diferença significativa entre o grupo portador de traço falciforme e grupo portador de AF, $p=0,048$ (figura 3).

Como foi observado redução de linfócitos T no grupo SS, foi optado pela realização da análise das subpopulações de linfócitos T. No sangue periférico existem 2 populações de linfócitos T com as seguintes características fenóticas: linfócitos T TCR $\gamma\delta$ positivo, o TCR $\beta\alpha$ positivo / CD4 positivo / CD8 negativo e o TCR $\beta\alpha$ positivo / CD4 negativo / CD8 positivo, didaticamente estes linfócitos são denominados como: linfócitos T auxiliar (CD4) e

T citotóxico (CD8). Na amostra houve uma menor frequência percentual de ambos os subtipos celulares em pacientes portadores de anemia falciforme, com este grupo (SS) apresentando uma média 31,2% ($\pm 7,97$) de linfócitos T auxiliares e 12,64% ($\pm 7,6$) de linfócitos T citotóxicos contra uma média de 43,47% ($\pm 7,77$) e 17,1% ($\pm 4,13$) no grupo AS e no grupo AA uma média de 45,35% ($\pm 4,52$) e 16,42% ($\pm 7,24$), respectivamente. Observamos que a redução de linfócitos T CD4 entre o grupo AA e os portadores de AF foi significativa ($p=0,04$), mas apesar da frequência de linfócitos TCD8 ser menor no grupo SS, essa diferença não foi significativa entre os grupos (AA x SS $p=0,20$ e AS x SS $p=0,43$) (figura 4). Logo, a redução de linfócitos T no grupo SS deve-se a redução de linfócitos T CD4.

Seguindo análise do processo imune que envolve esta doença, foi avaliado também os subtipos diferentes de células NK. De maneira global, no que concerne à frequência dos diferentes tipos de células NK entre grupos de pacientes estudados (AA, AS e SS) houve uma tendência a maior frequência de células NK no grupo de pacientes com hemoglobinopatia SS do que nos outros dois grupos, porém esta não foi significativa, dados representados graficamente na figura 5. Exporemos, entretanto, os resultados obtidos, de maneira individualizada, para os diferentes tipos celulares analisados intrinsecamente.

Na avaliação da população de células NK, foi optado pela diferenciação de três subtipos celulares, que se caracterizam fenotipicamente da seguinte maneira: CD3+, CD56+, CD16+ e CD69- (células NKT), CD3-, CD56+, CD16+ e CD69- (células NK comprometidas, imaturas) e CD3-, CD56+, CD16- e CD69+ (células NK maduras).

Inicialmente, na análise de células NKT, não houve diferença na frequência entre os diferentes grupos (média grupo AA=2,28%; $\pm 6,40$; grupo AS=0,19% $\pm 1,64$ e grupo SS=1,42% $\pm 1,82$) e um paciente do grupo AA apresentou uma frequência elevada deste tipo celular, mesmo atendendo todos os critérios de exclusão. Na população de células NK imaturas foi observado uma variação importante da frequência deste tipo celular no grupo AA (média do grupo AA=1,33% $\pm 1,53$), porém esta frequência foi mais uniforme nos outros grupos (média grupo AS=0,78% $\pm 0,71$ e grupo SS=2,5% $\pm 0,53$). Na comparação entre eles foi observado uma frequência significativamente maior de células NK imaturas no grupo SS comparado ao grupo AS, $p=0,007$. Por sua vez, em relação às células NK CD3-/CD56+/16+, observamos um aumento da frequência destas células, num gradiente crescente entre grupos AA, AS e SS (média do grupo AA=8,83% $\pm 4,73$ AS=11,2% $\pm 3,33$ e grupo SS=19,6% $\pm 8,77$), respectivamente, com diferença significativa entre o grupo AA e o grupo SS ($p=0,040$),

este aumento atinge a marca de 2,2 vezes a frequência deste tipo celular nos grupos de indivíduos sem hemoglobinopatias comparado aos portadores de AF (Figura 6).

4.4 DISCUSSÃO

O entendimento completo da fisiopatologia da doença falciforme, 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 hemoderivados, 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.

Logo a associação do processo inflamatório, liberação de DAMPS pela hemólise, lesão isquemia-reperfusão e ativação de células NKT, podem mais facilmente explicar uma doença complexa de amplo espectro clínico e a presença de múltipla disfunção de órgãos.

Na AF, observa-se uma leucocitose em sangue periférico. Estudo realizado por Dahmani *et al*, em 2016^[5], evidenciou leucocitose em 64,4% dos pacientes; as altas contagens de glóbulos brancos juntamente com as plaquetas parecem ser determinantes da gravidade da AF no Marrocos. Estudo que avaliou a capacidade vital pulmonar e a capacidade pulmonar total de paciente portadores de AF, observou que apenas a contagem de leucócitos e a idade eram fatores de risco independentes para uma capacidade vital pulmonar reduzida^[6]. Coorte realizada com crianças portadoras de AF, ratificou a importância da leucocitose na evolução para eventos clínicos relacionados a AF (acidente vascular encefálico, síndrome torácica aguda e crises algicas de repetição)^[7].

Apesar do papel da leucocitose estar bem relacionado com a gravidade na AF, o papel dos linfócitos T não foi totalmente definido. 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^[8]. Porém estudo realizado por Musa *et al* em 2010^[3], contradiz estudo anterior e não evidenciou diferença significativa na contagem de linfócitos CD3 e CD8 entre pacientes

portadores AF (em estado estacionário e durante crise de vasclusão) e grupo controle , porém observou frequência significativamente menor de linfócitos CD4, a mesma tendência, com relação aos linfócitos CD4, que foi identificado nos dados deste estudo.

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 DF^[9]. Ou 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.

Foram identificadas NETs promovidas por neutrófilos nos pulmões de camundongos portadores de AF^[10] e evidenciado que monócitos in vitro de pacientes portadores de AF, durante hemólise estimulavam a liberação de fator tecidual e quantidades significativas de TNF-a (alfa) e IL-1 β ^[11].

Já com relação às células NK, foi demonstrado que os linfócitos NKT têm uma participação significativa para o processo inflamatório presente na crise de vasclusão e que o bloqueio celular dos linfócitos NKT diminui a inflamação e a lesão pulmonar em modelos animais^[12]. Único estudo que avaliou a contagem de células NKT em sangue periférico, observou que este tipo celular está aumentado comparado ao grupo controle com pessoas saudáveis, logo corrobora com a hipótese que as células NKT possam orquestrar a cascata inflamatória^[4].

Os resultados obtidos no estudo também apontam para uma distribuição diferente da população de células NK em pacientes com AF e indivíduos controle^[4]. O indivíduo com AF apresentou maior porcentagem de células NK CD3-/CD56+/CD16+, 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 nestes três indivíduos.

Porém com relação aos níveis circulantes de linfócitos NKT (CD3+/CD56+/CD16/CD69-) eram menores no grupo SS, assim como o de linfócitos T CD4e CD8, talvez a haja uma fixação destes tipos celulares nos sítios de inflamação, logo a frequência destas células no sangue periférico seja menor.

Os resultados apresentados neste estudo apotam para a participação de linfócitos T e células NK na fisiopatologia da AF e como perspectiva futuras a avaliação seriada destas células, a relação com a evolução clínica do paciente e assim como sua funcionalidade, a partir da dosagem de interleuceninas e avaliação de resposta frente a estímulos (exemplo:

isquemia), deve ser levado em conta. Assim existirá uma visão mais complexa deste processo e poderá se identificar novos possíveis alvos terapêuticos ou marcadores de prognósticos que possam guiar estratégias para prevenção de danos crônicos a órgãos, visando retardar as complicações crônicas da AF.

4.5 CONCLUSÃO

Conclui-se que foi possível identificar uma menor frequência de linfócitos T e linfócitos T CD4 nos portadores de AF, um aumento na frequência de células NK maduras no grupo SS associado a uma frequência crescente entre os grupos e uma diferença de distribuição entre as células NK imaturas, comparado ao grupo com traço falciforme e indivíduos portadores de AF.

4.6 AGRADECIMENTOS:

Agradecemos a toda a equipe do laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Sergipe, que contribuíram com a execução deste estudo.

4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Costa FF, Conran N, Fertrin KY. Anemia Falciforme. In: Zago, MA, Falcão, RP, Pasquini, R. Tratado de Hematologia. Ed. Atheneu; 2013, p. 205-223.
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. Dahmani F, Benkirani S, Kouzih 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.

6. Tassel C, Arnauld C, Kulpa M, Fleurence E, Kandem A, Fouad M, Bernaudin F, Delacourt C. Leukocytosis is a risk factor for lung function deterioration in children with sickle cell disease. *Respiratory medicine*, 2011, 105(5):788-795.
7. 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
8. 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.
9. 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.
10. Chen G, Zhang D, Fuchs TA, Manwani D, Wagner DD, Frenette PS. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood*, 2014, 123(24):3818-3827.
11. Singhal R, Chawla S, Rathore DK, Bhasym A, Annarapu GK, Seth T, Guchhait P. Development of pro-inflammatory phenotype in monocytes after engulfing Hb-activated platelets in hemolytic disorders. *Clinical Immunology*, 2017, 175:133-142.
12. 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.

4.8. FIGURAS E QUADROS:

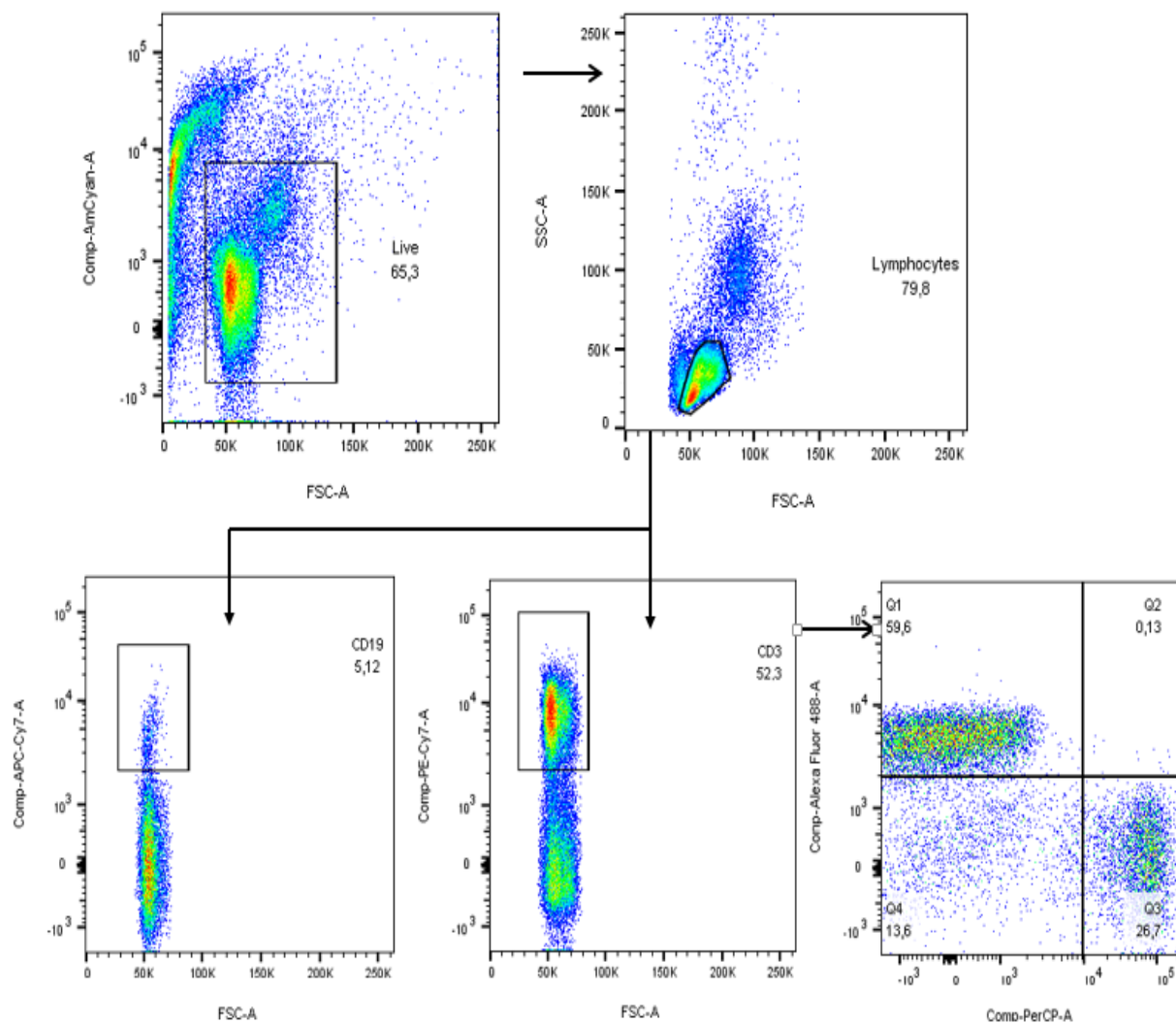
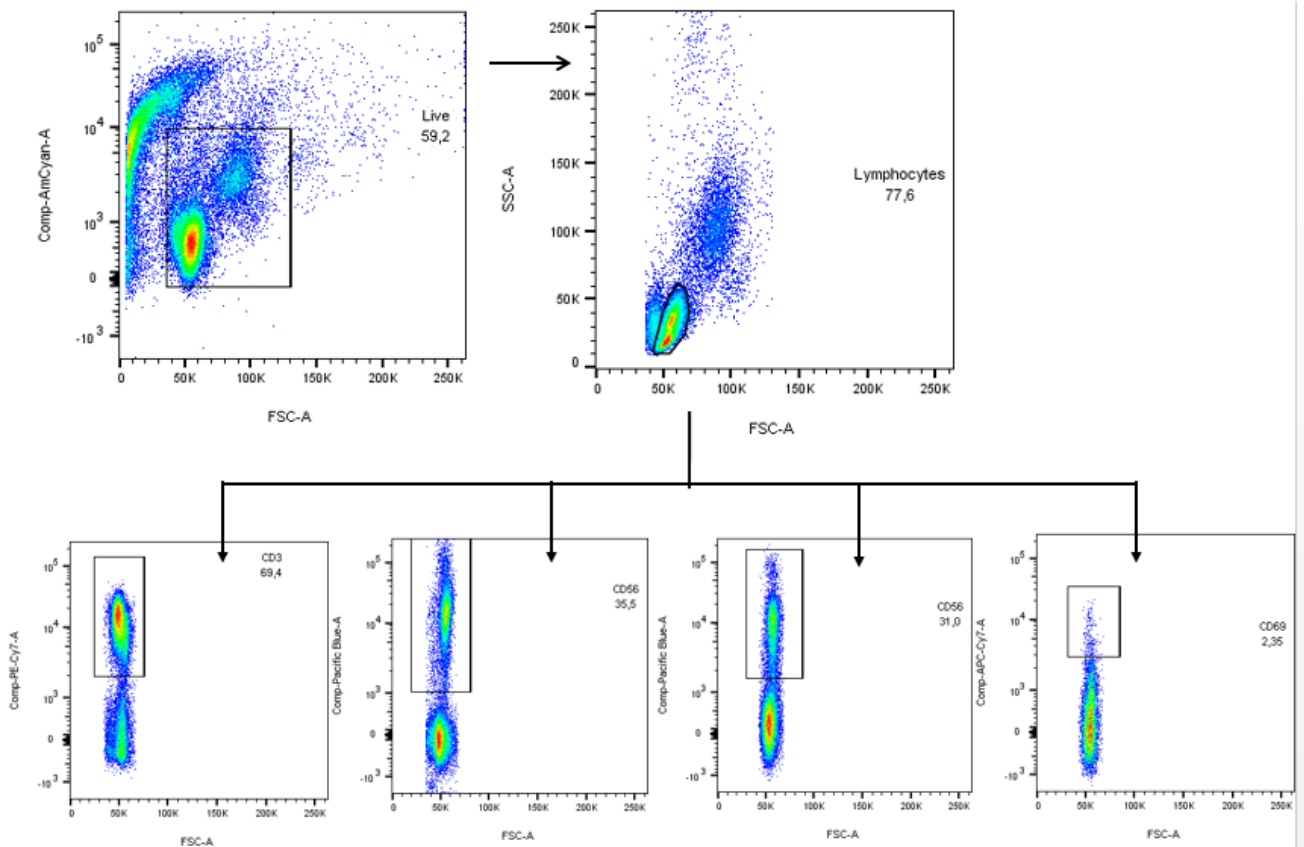


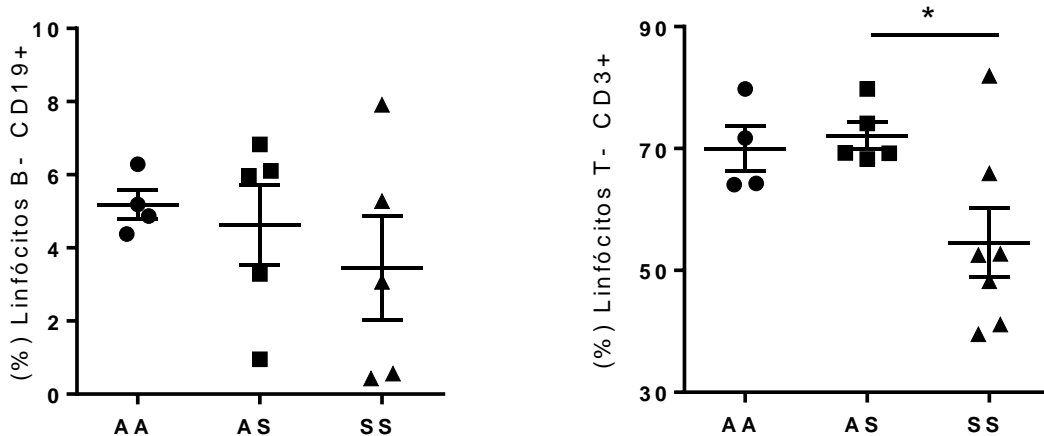
Figura 1: Histograma com estratégia de análise dos subtipos de linfócitos B e linfócitos T (CD4 e CD8). A: análise de FSC por Live/dead AmCyan, com gate nas células vivas. B: Análise de FSC por SSC, com gate na região de linfócitos. C: Análise de FSC por CD19 APCy7, com gate nas células CD19+. D: Análise FSC e CD3 PEcy7 com gate nas células CD3+. E: Análise a partir do gate de células CD3 +, avaliação de CD8 PEcy5 por CD4 FITC.



Fenótipos dos possíveis tipos celulares a partir da avaliação CD3, CD56, CD16, CD69:

CD3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CD56	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
CD16	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
CD69	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

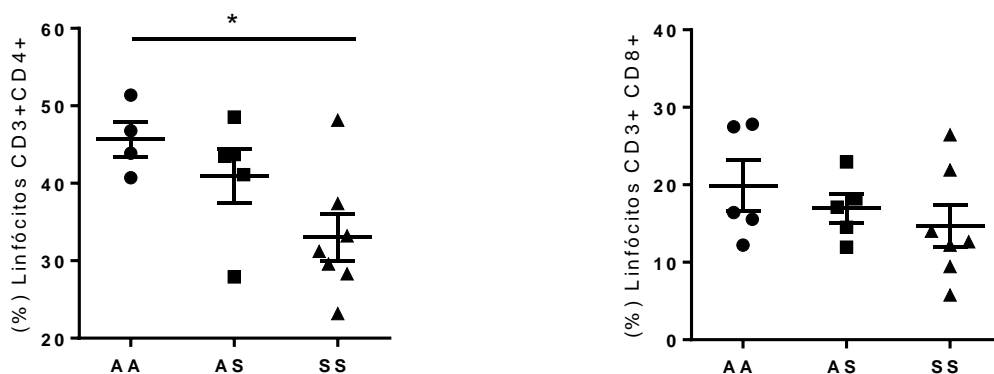
Figura 2: Histograma com estratégia de análise dos subtipos de células NK. A: análise de FSC por Live/dead AmCyan, com gate nas células vivas. B: Análise de FSC por SSC, com gate na região de linfócitos. C: Análise de FSC por CD3 PEcy7 APCy7, com gate nas células CD3+. D: Análise FSC e CD56 BV421 com gate nas células CD56+. E: Análise FSC e CD16 APC com gate nas células CD16+. F: Análise FSC e CD69 APCy7 com gate nas células CD69+.



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 entre grupo AS e SS, com $p=0,048$.

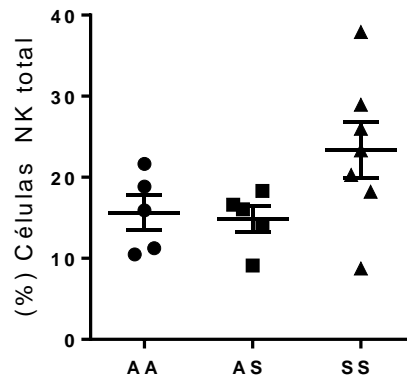
Figura 3: Proporção de subpopulações de linfócitos B (CD19+) e linfócitos T (CD3+), em termos percentuais, nos grupos de pacientes AA, AS e SS respectivamente.



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

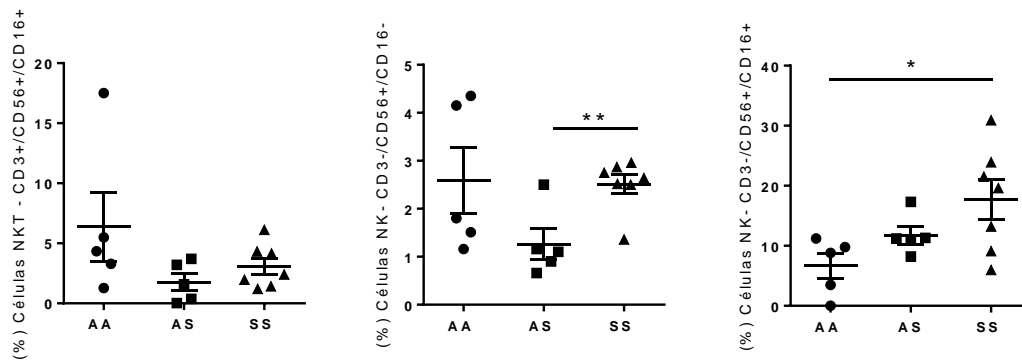
*Diferença significativa entre as médias de linfócitos T entre grupo AA e SS, com $p=0,042$.

Figura 4: Proporção de subpopulações de linfócitos T CD4 e 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.

Figura 5: Proporção de células NK totais, em termos percentuais, nos grupos 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 médias de linfócitos T entre grupo AS e SS, com $p=0,007$.

* Diferença significativa entre as médias de linfócitos T entre grupo AA e SS, com $p=0,040$.

Figura 6: Proporção de linfócitos NKT (CD3+/CD56+/CD16-) e células NK (CD3+CD56+/CD16+ e CD3-/CD56+/CD16-), em termos percentuais, nos grupos AA, AS e SS respectivamente.

6. APÊNDICES

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 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 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.

Aracaju, __/__/____

Pesquisador responsável