



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA - PPGIBA**



**PERFIL IMUNE FENOTÍPICO ASSOCIADO A PARÂMETROS
LABORATORIAIS E GRAVIDADE CLÍNICA NA ANEMIA
FALCIFORME**

NADJA PINTO GARCIA

MANAUS – AM

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA - PPGIBA**



**PERFIL IMUNE FENOTÍPICO ASSOCIADO A PARÂMETROS
LABORATORIAIS E GRAVIDADE CLÍNICA NA ANEMIA
FALCIFORME**

NADJA PINTO GARCIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como avaliação do exame de defesa de Doutorado para a obtenção do título de Doutor em Imunologia na área de concentração “IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA” e linha de pesquisa “DOENÇAS MEDIADAS POR MECANISMOS IMUNES - RESPOSTA CELULAR E HUMORAL”.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Adriana Malheiro Alle Marie

COORIENTADORES: Prof. Dr. Érich Vinícius de Paula

Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho

MANAUS – AM

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G216p Garcia, Nadja Pinto
Perfil imune fenotípico associado a parâmetros laboratoriais e gravidade clínica na anemia falciforme. / Nadja Pinto Garcia . 2019
105 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Adriana Malheiro Alle Marie
Coorientador: Érich Vinícius de Paula
Coorientador: Olindo Assis Martins Filho
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Anemia falciforme. 2. Biomarcadores. 3. Perfil imune. 4.
Reticulocitose. 5. Risco de morte. I. Marie, Adriana Malheiro Alle. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Adriana Malheiro Alle Marie, presidente
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof^a. Dr^a. Aya Sadahiro
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof^a. Dr^a. Kátia Luz Torres Silva
Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON)

Prof^a. Dr^a Andréa Teixeira de Carvalho
Instituto René Rachou/FIOCRUZ MINAS

Prof. Dr. Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

APROVADA EM:

___ 23 ___ / ___ 04 ___ / ___ 2019 ___

Dedicatória

Aos meus amados pais, Antônio e Nadyanara, pela minha vida, investimento, por me ensinarem o caminho correto, por me estimularem desde pequena a gostar de estudar, pelo apoio e amor incondicional sempre!

A minha querida irmã Izabella, grande amiga e companheira em todos os momentos!

Ao meu amor, Francisco Romero, pelo companheirismo, amor, compreensão, paciência, pelos nossos momentos de alegria, brincadeiras e gargalhadas e por me estimular todos os dias a ser uma pessoa melhor!

Aos meus maravilhosos amigos, pelos conselhos e pela amizade que alivia o sofrimento e proporciona alegria!

Agradecimentos

A Deus, por me dar saúde, perseverança e força para resistir às dificuldades encontradas ao longo do caminho.

Aos meus pais, por todo o amor, paciência, dedicação, educação e por serem os responsáveis por grande parte da minha vitória.

A minha irmã pela amizade, paciência, instrução e força em todos os momentos.

Aos meus tios e primos pelo carinho.

Ao meu namorado, meu amor, por me fazer rir, por me dar força e me incentivar sempre!

Aos pacientes com anemia falciforme, pois sem eles não seria possível a realização dessa pesquisa.

A minha orientadora, Dra. Adriana Malheiro, pela confiança, ter aceitado trabalhar comigo desde 2009, investimento, conhecimentos transmitidos, valiosa orientação e amizade.

As minhas amigas Juliana Palheta, Melissa Lury e Flávia Rochelle por toda a amizade, risadas e apoio ao longo desses 12 anos.

Aos meus amigos da Citologia Clínica do Laboratório Municipal de Especialidades Prof. Sebastião Ferreira Marinho/SEMSA, por toda amizade e por deixarem as minhas tardes de trabalho muito mais leve e divertida, aliviando meu estresse durante o doutorado.

Aos meus prestativos alunos de iniciação científica, agora futuros mestres, Alexander Leonardo, Geyse Adriana, Thainá Costa e Alicia Patrine pelo compromisso, cuidado com nossa pesquisa, pela paciência e pela valiosa e fundamental ajuda em todas as etapas desse trabalho.

Aos meus companheiros de trabalho do LABGEN/HEMOAM, Andréa Tarragô, Victória Sposina, Luciana Cassa, Rechfy Kasem e Allyson Guimarães pelo incentivo, carinho, apoio, solidariedade, conversas e risadas.

A todos os amigos da NAEF, pelos momentos de descontração e apoio.

Ao prof. Dr. Olindo Martins Assis Filho pela instrução maravilhosa, por compartilhar seus fantásticos conhecimentos científicos, pela instrução da análise estatística do meu trabalho e com tudo isso por contribuir para o meu crescimento profissional.

A prof^a. Dra. Andréa Teixeira pelo acolhimento durante os experimentos na FIOCRUZ/MINAS, pela atenção, instrução científica e por colaborar com meu crescimento profissional.

Ao prof. Dr. Érich Vinícius de Paula, meu co-orientador, pelas ideias maravilhosas e questões científicas muito pertinentes que engrandeceram meu trabalho.

A Ana Carolina Campi e Lorena Souza do Instituto René Rachou/FIOCRUZ-MINAS, pelo auxílio na execução da técnica de Luminex para dosagem de citocinas do meu trabalho.

A Dra. Rejane Nina, hematologista da Fundação HEMOAM, pelo auxílio na abordagem dos pacientes com anemia falciforme.

A Dra. Flávia Pontes, bioquímica da Fundação HEMOAM, por facilitar o atendimento do paciente nos dias de coleta e pela execução do exame de hemograma.

A Fundação HEMOAM pela oportunidade e espaço cedido para execução desse trabalho.

A CAPES, CNPq e a FAPESAM pelo apoio financeiro.

A Universidade Federal do Amazonas-UFAM, minha casa, que me proporcionou ser uma farmacêutica-bioquímica mestre e doutora.

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada e seu corpo docente pela oportunidade de ser doutora.

*A mente que se abre
a novas ideias
jamais retorna ao seu tamanho original.*
Albert Einstein

RESUMO

A anemia falciforme (AF) está associada a um estado pró-inflamatório crônico caracterizado por elevada contagem de leucócitos, mortalidade por infecções recorrentes graves e subsequentes complicações vaso-oclusivas com adesão de leucócitos ao endotélio e aumento dos níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias. O sistema imunológico tem estreita ligação com a morbidade na anemia falciforme, porém estudos detalhados sobre o envolvimento dos sistemas imune inato e adaptativo na modulação da fisiopatologia da AF são necessários e relevantes. Nesse estudo foi avaliado o perfil de células inatas e adaptativas, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, expressão de receptores Toll-like e expressão de moléculas de adesão de pacientes com AF e doadores saudáveis com o intuito de prever biomarcadores, a relação entre eles e sua correlação com registros laboratoriais e risco de morte. A imunofenotipagem de células, receptores Toll-like, moléculas de adesão e dosagem de citocinas / quimiocinas / fatores de crescimento foram realizadas a partir de amostras de sangue periférico de pacientes com AF e doadores saudáveis por citometria de fluxo e técnicas de luminex, respectivamente. As células da imunidade adaptativa, Th1, Th17 e citocinas reguladoras, quimiocinas IL-8, IP-10, MIP- α , MIP- β e RANTES e fatores de crescimento VEGF, bFGF e GM-CSF foram maiores em pacientes com AF que em doadores saudáveis em qualquer condição laboratorial e clínica. Pacientes com alto risco de morte parecem ter biomarcadores relevantes. Conclusão. Na fisiopatologia da AF no estado estacionário há uma ampla rede de interação de biomarcadores imunológicos destacada por linfócitos TCD4⁺ CD69⁺, citocinas IL-12 e IL-17 inflamatórias e reguladora IL-10, quimiocinas MIP- α , MIP- β e IP-10 e fator de crescimento VEGF. A alta expressão de TLR2 em monócitos e VLA-4 em linfócitos TCD8⁺ e altos níveis de MIP- β e RANTES parece ser relevante em condições de alto risco de morte. As elevadas condições de reticulocitose e alto risco de morte apresentam correlações comuns, parece haver equilíbrio pelo perfil Th2. Mesmo assim, são necessários mais estudos abordando os mesmos biomarcadores nos mesmos pacientes em crise ou outros biomarcadores, vias de sinalização intracelular, análise da expressão gênica de moléculas envolvidas em respostas imunes inatas e adaptativas para entender melhor esse complexo mecanismo fisiopatológico da AF.

Palavras-chaves: Anemia falciforme, biomarcadores, perfil imune, reticulocitose, risco de morte.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is associated with a chronic pro-inflammatory state characterized by elevated leukocyte count, mortality from severe recurrent infections, and subsequent vaso-occlusive complications with leukocyte adhesion to the endothelium and increased plasma levels of inflammatory cytokines. The immune system has a close connection with morbidity in sickle cell anemia, but further studies are needed to uncover the involvement of innate and adaptive immunities in modulating the SCA pathophysiology. We performed the frequency of innate and adaptive immunity cells, cytokines, chemokines and growth factors measurement, Toll-like receptors and adhesion molecules expression in the blood of SCA patients and healthy donors to evaluate the different profile of these biomarkers, the relationship among them and its correlation to laboratory records and death risk. The immunophenotyping of cells, Toll-like receptors, adhesion molecules and cytokine/chemokine/growth factors measurement were performed from peripheral blood samples from SCA patients and healthy donors by flow cytometry and luminex techniques, respectively. The cells of the adaptive immunity, Th1, Th17 and regulatory cytokines, IL-8, IP-10, MIP- α , MIP- β and RANTES chemokines and VEGF, bFGF and GM-CSF growth factors were higher in SCA patients than healthy donors regardless any laboratorial and clinical condition. Although, high death risk appears to have relevant biomarkers. In the SCA pathophysiology at steady state there are a broad immunological biomarker cross-talk highlighted by TCD4⁺CD69⁺ lymphocytes, IL-12 and IL-17 inflammatory and IL-10 regulatory cytokines, MIP- α , MIP- β and IP-10 chemokines and growth factor VEGF. High expression of TLR2 in monocytes and VLA-4 in TCD8⁺ lymphocytes and high levels of MIP- β and RANTES appears to be relevant in high death risk condition. The high reticulocytosis and high death risk conditions present commons correlations there seems to be balance by Th2 profile. However, further studies are needed to establish a selective biomarker and to better understand this complex pathophysiological mechanism of sickle cell anemia.

Key words: Sickle cell anemia, biomarkers, immune profile, reticulocytosis, death risk.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização do agrupamento de genes das globinas do tipo alfa e sua região reguladora.....	20
Figura 2: Organização do agrupamento de genes das globinas do tipo beta e sua região reguladora.....	20
Figura 3: Estrutura quaternária da molécula de hemoglobina.....	21
Figura 4: Formação da HbS a partir de uma troca da base nitrogenada Adenina (A) pela Timina (T), levando a produção do aminoácido valina no lugar do ácido glutâmico.	23
Figura 5: Polimerização da hemoglobina S.....	24
Capítulo I.....	
Figure 1. Phenotype profile of innate immunity components in SCA patients.....	51
Figure 2. Phenotype profile of adaptative immunity components in SCA patients.....	53
Figure 3. Phenotype profile of innate and adaptative immunity components in SCA subgroups.....	54
Figure 4. The cytokine/chemokine/growth factors profile in SCA patients.....	56
Figure 5. The cytokine/chemokine/growth factors profile in SCA subgroups.....	58
Figure 6. Cellular and serum biomarkers signatures in SCA subgroups.....	61
Figure 7. Cellular and serum biomarker networks in SCA patients.....	63
Figure 8 Cellular biomarker network in SCA patients categorized into subgroups referred as low and high reticulocytosis, thrombocytosis and death risk.....	65
Figure 9 Serum biomarker network in SCA patients categorized into subgroups referred as low and high reticulocytosis, thrombocytosis and death risk.....	67

LISTA DE TABELAS

Table 1: Study Population.....48

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Anemia Falciforme
AF647	Alexa-Fluór 647
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Alofocianina
ARB	Arábia-Indiana
ATP	Adenosina Trifosfato
BAN	Bantu
BEM	Benin
BSA	Albumina de Soro Bovino
Cl⁻	Cloreto
CD	Cluster Differentiation
DFs	Doenças Falciformes
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
Hb	Hemoglobina
Hct	Hematócrito
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HMGB1	High Mobbilit Group box -1
IFN-γ	Interferon-gama
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-17	Interleucina-17
IL-18	Interleucina-18
IL-1R1	Receptor 1 de Interleucina 1
IP-10	Proteína 10 induzida por interferon-gama
K⁺	Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
KH₂PO₄	Fosfato de Potássio
LCR	Região de Controle do Locus
LDH	Lactato Desidrogenase
LFA	Antígeno associado a função do linfócito
LRR	Repetições Ricas em Leucinas
Mac-1	Moléculas de Adesão Celular-1
MAIT	Célula T invariante associada à mucosa
MCP-1	Proteína 1 Quimioatraente de Monócitos
MIG	Monocina Induzida pelo Inteferon-gama
NaCl	Cloreto de Sódio
Na₂HPO₄	Fosfato de Sódio
NBL	Domínio Ligante de Nucleotídeo
NF-κB	Factor Nuclear Kappa B
NK	Natural Killer

NO	Óxido Nítrico
PBS-W	Tampão Salino Fosfato – Wash
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Clorofila Peridina
RANTES	Regulação da Ativação da Célula T Normal Expressada e Secretada
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SCD	Sickle Cell Disease
SCA	Sickle Cell Anemia
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TCLE	Termo de Compromisso Livre e Esclarecido
Th1	Célula T auxiliar 1
TLR	Receptor do Tipo Toll
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alpha
TNF-R1	Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral alpha
TNF-R2	Receptor 2 do Fator de Necrose Tumoral alpha
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1
VCM	Volume Corpuscular Médio
VLA-4	Molécula de Adesão Vascular Celular-4
WHO	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1 Hemoglobina: síntese, estrutura e tipos.....	20
1.2 Hemoglobinopatias.....	23
1.3 Anemia Falciforme	26
1.3.1 Fisiopatologia e Manifestações Clínicas	26
1.3.2 Interação do Sistema Imune na Fisiopatologia da Anemia Falciforme.....	29
1.4 Diagnóstico Laboratorial e Tratamento das Doenças Falciformes.....	32
2. OBJETIVOS	36
2.1 Geral:	36
2.2 Específicos.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Tipo de Estudo.....	37
3.2 População de Estudo.....	37
3.3 Participantes do Estudo	37
3.4 Critérios de Inclusão e Exclusão	37
3.5 Aspectos Éticos.....	37
3.6 Procedimentos	38
3.6.1 Coleta de Dados e Amostra Biológica.....	38
3.6.2 Testes Hematológicos.....	38
3.6.3 Imunofenotipagem celular <i>ex vivo</i> por Citometria de Fluxo	38
3.6.4 Dosagem de Citocinas, Quimiocinas e Fatores de Crescimento por Ensaio Luminex.....	40
3.7 Análise de Dados e Estatística Convencional.....	41
3.8 Análise da Assinatura de Biomarcador	42
3.9 Análise da Rede de Biomarcadores	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
CAPÍTULO I:	43
5. CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS	95
ANEXOS	101
Anexo I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 5641331690000.0009).....	101
Anexo II: Artigo Publicado na revista Journal of Immunology Research.	105

INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias, ou seja, os distúrbios das hemoglobinas humanas constituem um grupo heterogêneo de doenças geneticamente determinadas. Clinicamente, as mais importantes são aquelas que envolvem os genes das cadeias α e β da globina (DRISS et al., 2009). Entre as hemoglobinopatias, as doenças falciformes (DFs) são as desordens monogênicas mais prevalentes, responsáveis por alta mortalidade e morbidade com uma sobrevivência média estimada de 45 a 48 anos na sociedade ocidental (BEERS et al., 2014). Aproximadamente 5% da população mundial carrega traço genético para hemoglobinopatias, como doenças falciformes e talassemias (MODELL; DARLISON, 2008; MOHANTY, 2014). Estima-se que a cada ano 300.000 bebês nascem com a forma grave (homozigotos), em nível mundial, principalmente na África subsaariana, Oriente Médio e Índia. Os padrões de migração têm levado a distribuição do gene de células falciformes para áreas não endêmicas de malária, como áreas da Europa e USA. Prevê-se que o número de recém-nascidos com anemia falciforme em nível mundial vai aumentar de 305.800 em 2010 para 404.200 em 2050, consistindo em um problema de saúde pública com alta morbidade e mortalidade em várias nações (BEERS et al., 2014).

No Brasil, em 2016, 1.071 recém-nascidos tinham doença falciforme (DF) e > 60.000 eram heterozigotos para o alelo β S. Há cerca de 30.000 indivíduos com anemia falciforme em todo o país (BRAGA et al., 2016; BRASIL, 2014; LERVOLINO et al., 2011) e a prevalência de heterozigotos para HbS nas regiões Norte e Nordeste é mais alta, cerca de 6 a 10%, enquanto nas regiões Sul e Sudeste a prevalência é menor 2 a 3% (SILVA-PINTO et al., 2013; SILVA, 2015). Essa alta carga global de pacientes com doença falciforme e seu impacto na saúde coletiva devem estimular o investimento em pesquisas científicas sobre os mecanismos moleculares e imunológicos da doença e alternativas terapêuticas (MOHANTY, 2014; SARAF et al., 2014).

O termo “doença falciforme” refere-se a um grupo de desordens que resultam de uma mutação pontual da troca de adenina pela timina (GAG \rightarrow GTG) no sexto códon do gene da β -globina (β S). Esta alteração conduz uma substituição do ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia polipeptídica, refletindo em uma forma anormal de hemoglobina (HbS). A herança heterozigota da hemoglobina HbS, isto é, associadas a outras hemoglobinas (HbSC, HbSD, HbSE) ou com mutações β -talassêmicas que levam a produção reduzida da β -globina normal (DF S/ β -talassemia) terão consequências fisiopatológicas características (NAGEL; FABRY; STEINBERG, 2003). A forma mais comum (>70% das doenças falciformes no

mundo) e a mais grave, resulta da herança homocigota a qual é usualmente referida como sendo DF SS ou HbSS ou anemia falciforme (AF) (CHAKRAVORTY; WILLIAMS, 2015a; RUSANOVA et al., 2011). Cada genótipo possui sua própria diversidade fenotípica, que está suscetível a ser geneticamente modulada (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; STEINBERG, 2009), no entanto, indivíduos com anemia falciforme a gravidade das manifestações clínicas e hematológicas é extremamente heterogênea, variando de ausência de sintomas a mortalidade infantil, podendo estar associada com os níveis de hemoglobina fetal (HbF) e os diferentes haplótipos de β^s -globina (CARVALHO-DOS SANTOS et al., 2012; RUSANOVA et al., 2011).

A formação e polimerização da HbS induz uma série de alterações nas hemácias, como o afoçamento dos eritrócitos em condições de hipóxia, as quais levarão a várias alterações fisiológicas, com a resposta inflamatória tendo um papel central, e diversas apresentações clínicas, tais como anemia hemolítica, adesão celular ao endotélio, disfunção endotelial e vaso-occlusão com dor intensa, acidente vascular cerebral, síndrome torácica aguda, úlceras de perna e falência de órgãos. Essas complicações são as razões mais comuns de internações emergenciais de pacientes (DRISS et al., 2009; MEKONTSO DESSAP et al., 2014; SARAF et al., 2014). Essa variabilidade pode ser explicada por modificadores genéticos, incluindo fatores que afetam o nível de HbF e a co-herança da talassemia- α ou ainda fatores ambientais (como o ambiente doméstico, estado socioeconômico, nutrição, culturais, epigenético e acesso a cuidados especializados) e modulação pelo sistema imune. É muito difícil determinar os fatores exatos que regulam a gravidade dessas doenças (BELINI JUNIOR et al., 2015; CHIES; NARDI, 2001; KATO et al., 2018; MUSA et al., 2010).

O sistema imune tem estreita ligação com a morbidade na anemia falciforme, mas estudos adicionais são necessários para revelar o envolvimento de imunidades inata e adaptativa na modulação da fisiopatologia da AF (CHIES; NARDI, 2001; MUSA et al., 2010). Estudos com pacientes falcêmicos da região norte do Brasil muito provavelmente trarão informações importantes, devido às diferenças genéticas entre populações e a influência de diversos fatores nos mecanismos celulares e moleculares. Estudos limitados conduzidos até agora indicaram anormalidades no sistema imune adaptativo dos indivíduos com AF e que podem afetar a reatividade a vacina nesses indivíduos (BALANDYA et al., 2017). Investigações mais detalhadas sobre o perfil imunológico tanto sistema imune inato quanto adaptativo de pacientes com AF em estado estacionário trarão informações valiosas para o monitoramento clínico desses indivíduos.

Neste contexto, investigamos a frequência de células das imunidades inata e adaptativa, os níveis de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, expressão de receptores Toll-like e de moléculas de adesão no sangue de pacientes com AF e doadores saudáveis para avaliar os diferentes perfis desses biomarcadores, a relação entre eles e sua correlação com parâmetros laboratoriais e risco de morte.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Hemoglobina: síntese, estrutura e tipos.

A hemoglobina (Hb) é a principal proteína contida no interior dos eritrócitos, tendo como principal função o transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos, mas também interage especificamente com 3 outros gases, dióxido de carbono, monóxido de carbono e óxido nítrico, que tem importantes papéis biológicos. Cada eritrócito contém aproximadamente 640 milhões moléculas de hemoglobina (MARENGO-ROWE, 2006; SCHECHTER, 2008).

Na espécie humana e em outros vertebrados são verificadas mudanças nos diferentes tipos de hemoglobinas como forma de adaptação à disponibilidade de oxigênio durante o desenvolvimento do organismo (NAOUM, 1997a). Durante o desenvolvimento intrauterino, o oxigênio transportado pela hemoglobina é fornecido pelo sangue materno através da placenta e com o nascimento passa a ser captado nos pulmões diretamente do ar atmosférico (OSÓRIO-BORGES; ROBINSON, 1993). A síntese dos diferentes tipos de hemoglobinas embrionárias, fetal e adultas obedece a um rígido controle genético, envolvendo os genes tipo alfa do cromossomo 16 e os do tipo beta do cromossomo 11, os quais são expressos de acordo com o desenvolvimento embrionário fetal. As hemoglobinas embrionárias são sintetizadas gradativamente até atingir suas concentrações máximas específicas, depois se inicia a diminuição de suas sínteses, dando lugar a elaboração de Hb Fetal e a seguir das adultas HbA e HbA₂ (HIGGS et al., 1989; NAOUM, 1997a)

rias, fetal e adultas obedece a um rígido controle genético, envolvendo os genes tipo alfa do cromossomo 16 e os do tipo beta do cromossomo 11, os quais são expressos de acordo com o desenvolvimento embrionário fetal. As hemoglobinas embrionárias são sintetizadas gradativamente até atingir suas concentrações máximas específicas, depois se inicia a diminuição de suas sínteses, dando lugar a elaboração de Hb Fetal e a seguir das adultas HbA e HbA₂ (HIGGS et al., 1989; NAOUM, 1997a)

A síntese das globinas do tipo alfa inclui as globinas zeta e alfa, realizada por um grupo (*cluster*) de genes constituído por genes estruturais sendo dois alfas (α_1 e α_2), que permanecem em atividade durante toda a vida do indivíduo, genes zeta (ζ), de atuação somente na fase embrionária, três pseudogenes ($\psi\zeta$ psi-zeta, $\psi\alpha_2$ psi-alfa 2 e $\psi\alpha_1$ psi-alfa 1), os quais possuem sequências idênticas a um gene de globina, mas contém mutações que inibem sua expressão tornando-os silenciosos (inativos), e um gene teta (θ_1), cuja função ainda não é muito bem definida (**Figura 1**) (HIGGS et al., 1989; NAOUM, 1997a; SCHECHTER, 2008). O ritmo normal de síntese dos genes alfas é muito elevado, uma vez que a globina alfa participa da composição de todas as hemoglobinas (NAOUM, 1997a). A expressão dos genes alfa globina é regulada por elementos localizados no próprio gene em regiões adjacentes a ele, e por uma sequência denominada HS-40, localizada a 40Kb do gene zeta. Esse sítio age como um elemento *enhancer* eritróide específico ao interagir com fatores de transcrição de genes intimamente ligados (SCHECHTER, 2008).

Cluster de Genes Alfa (Cromossomo 16)

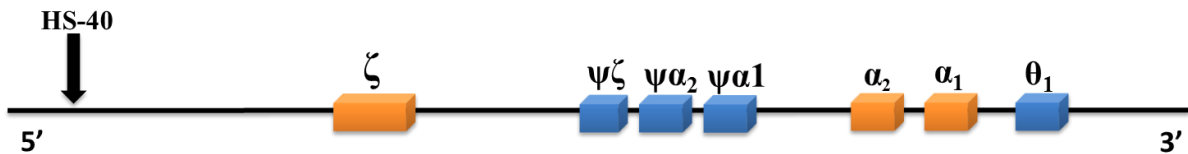


Figura 1: Organização do agrupamento de genes das globinas do tipo alfa e sua região reguladora.
Fonte: Adaptado de Schechter, 2008.

As globinas do tipo beta, produzidas pela expressão do *cluster* de genes beta, são sintetizadas de forma mais heterogênea e abrangente, pois envolve a produção das globinas beta, delta, gama e épsilon. Esse agrupamento é constituído por cinco genes estruturais, épsilon (ϵ), expresso na fase embrionária; genes gama-alanina (γ^A) e gama-glicina (γ^G), característicos do período fetal; genes delta (δ) e beta (β), os quais são atuantes a partir de uma fase do período fetal e se expressam por toda a vida após o nascimento; e um pseudogene psi-beta ($\psi\beta$) (**Figura 2**) (NAOUM, 1997a; SCHECHTER, 2008). A expressão dos genes do *cluster* beta-globina é regulada pela sua proximidade a um grupo que contém cinco segmentos de DNA denominados *Locus Control Region* (LCR) (**Figura 2**). Essa região é hipersensível à clivagem pela nuclease DNAase I e parece contribuir significativamente para a expressão sequencial 5'-3' dos genes globina durante o desenvolvimento, além de contribuir para a concentração alta de hemoglobina no eritrócito normal (DEAN, 2006; LI et al., 2002; ORKIN, 1995; SCHECHTER, 2008).

Cluster de Genes Beta (Cromossomo 11)

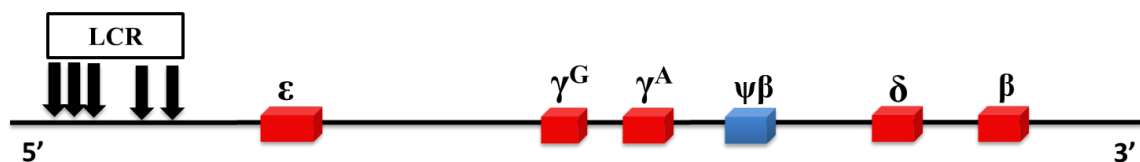


Figura 2: Organização do agrupamento de genes das globinas do tipo beta e sua região reguladora.
Fonte: Adaptado de Schechter, 2008.

As moléculas de hemoglobina humana constituem uma estrutura quaternária de proteínas relacionadas intimamente, formada por pareamento simétrico de um dímero de cadeias polipeptídicas de globinas em uma unidade estrutural e funcional tetramérica ligadas a 4 grupos prostético heme (**Figura 3**) (NAOUM, 1997b; NETO; PITOMBEIRA, 2003; SCHECHTER, 2008).

No período embrionário o primeiro tetrâmero hemoglobínico é formado por cadeias zeta e épsilon ($\zeta_2\epsilon_2$), as quais formam a Hb Gower-1, presente nas 4 semanas iniciais do período

embrionário. A partir desse período até a 12^a semana, as hemoglobinas são compostas por pares de cadeia zeta e gama ($\zeta_2\gamma_2$) constituindo o tipo Portland, e quando ocorre a produção das cadeias alfa, estas se combinam com a cadeia épsilon e forma a hemoglobina Gower-2 ($\alpha_2\epsilon_2$) (NAOUM, 1997b; NETO; PITOMBEIRA, 2003). Por grande parte da vida intrauterina prepondera a produção da Hb fetal ($\alpha_2\gamma_2$), cuja produção tem início na quarta semana de gestação devido ao incremento da produção das cadeias alfa e gama, com aumento do seu nível quantitativo progressivo ao desenvolvimento fetal, porém nos primeiros seis meses de vida, a produção da HbF decai (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2004; NAOUM, 1997b; NETO; PITOMBEIRA, 2003).

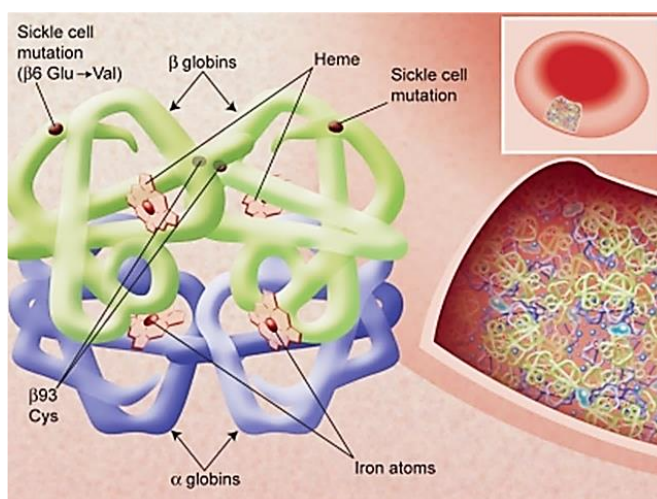


Figura 3: Estrutura quaternária da molécula de hemoglobina.

Fonte: Schechter, 2008 (desenho de Irving M. Geis e ilustração de Alice Y. Chen).

A hemoglobina adulta HbA, composta por dímeros de cadeias alfa e beta ($\alpha_2\beta_2$), é sintetizada a partir da 10^a semana e se mantém em concentrações próximas a 10% até o nascimento, pois o gene da cadeia beta (β) globínica é expresso, com pouca intensidade, nas primeiras seis semanas de vida fetal, mas a partir deste período ocorre uma mudança (*switch*), quando a síntese da cadeia γ é substituída pela β dando origem a produção da HbA que permanece nos eritrócitos por toda fase adulta (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2004; NAOUM, 1997b) Por volta da 25^a semana de gestação inicia-se a produção das cadeias delta (δ) em concentrações reduzidas até o nascimento, aumentando lentamente e estabilizando-se por volta do sexto mês de vida em diante. Quando as cadeias δ ligam-se as cadeias α originam a HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$). A distribuição proporcional das diferentes hemoglobinas nos eritrócitos após os seis meses iniciais de vida é: HbA 96-98%, HbA₂ 2,5-3% e HbF 0-1% (SCHECHTER, 2008).

1.2 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são desordens monogênicas, caracterizadas por anomalias na estrutura, produção ou função de cadeias globínicas que levam à baixa produção ou ausência de hemoglobina com uma conseqüente heterogeneidade clínica e fenotípica (COSTA et al., 2015). As alterações (mutações) que envolvem as globinas se devem à modificação nos genes responsáveis pelo sequenciamento e estrutura de cada tipo de polipeptídeo (Hb variantes), bem como naqueles destinados à regulação quantitativa da síntese de polipeptídeos (talassemias) (NAOUM, 1997b; THOM et al., 2013). Menos frequentemente, ambos fenótipos podem estar presentes em um mesmo indivíduo (concomitante variação estrutural e síntese reduzida) (SONATI; COSTA, 2008). Quando um determinado gene apresenta uma de suas bases nitrogenadas substituída por outra diferente, isso resulta na troca de um aminoácido e conseqüentemente na formação de moléculas de hemoglobinas com características bioquímicas alteradas em relação as hemoglobinas normais, e por isso são chamadas de hemoglobinas variantes (DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY, 2004; URBINATI; MADIGAN; MALIK, 2006).

As hemoglobinopatias apresentam alta morbidade e mortalidade e estão entre as doenças monogênicas mais comuns, as quais afetam um número estimado de 7% da população mundial, cerca de 330.000 recém-nascidos a cada ano, com mais de 1000 alelos mutantes diferentes (MARTINEZ et al., 2014; SONATI; COSTA, 2008; THEIN, 2013; THOM et al., 2013). As mais significantes são a β -Talassemia e as Doenças Falciformes (DF) e de acordo com a OMS tem sido estimado cerca de 1,5% da população global sejam carreadores de β -Talassemia, enquanto cerca de 70% das crianças sofrem de DF (COSTA et al., 2015; MARTINEZ et al., 2014). As talassemias consistem em um conjunto de síndromes motivadas principalmente por alterações de sínteses quantitativas de globinas alfa e beta, causando desequilíbrio entre elas (NAOUM, 1997b; PATRINOS; KOLLIA; PAPADAKIS, 2005).

Na DF ocorre uma mutação na sexta posição da β -globina que levam a substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina (**Figura 4**). Essa mudança resulta na formação de uma hemoglobina anormal, denominada HbS, a qual polimeriza em estado desoxigenado, induzindo uma deformação nos eritrócitos com a forma característica de foice (COSTA et al., 2015; NAOUM, 1997b).

Mutação na HbA e formação da HbS

Aminoácidos	5	6	7
Bases nitrogenadas da globina β A	CCT	GAG	GAG
Aminoácidos da globina β A	Pro	Glu	Glu
Bases nitrogenadas da globina β S	CCT	GTG	GAG
Aminoácidos da globina β S	Pro	Val	Glu




Figura 4: Formação da HbS a partir de uma troca da base nitrogenada Adenina (A) pela Timina (T), levando a produção do aminoácido valina no lugar do ácido glutâmico.

Fonte: Adaptado de Naoum, 1997.

A polimerização da HbS ocorre, pois apresenta sua estrutura molecular abalada pela troca de aminoácidos. Na HbA, o ácido glutâmico confere característica polar a hemoglobina, tornando-a mais solúvel, e previne interações intermoleculares e assim auxilia no afastamento de moléculas desoxigenadas de hemoglobinas. Quando a HbS está na forma desoxigenada (baixa tensão de oxigênio) o aminoácido valina, de característica apolar, é exposto na superfície da β -globina, o que permite interações intermoleculares hidrofóbicas com os receptores fenilalanina e leucina na molécula adjacente de HbS e a formação de polímeros compostos por 14 fibras de desoxiemoglobinas, enoveladas entre si, num processo denominado nucleação, que progride com o alongamento e alinhamento de mais fibras, criando uma estrutura multipolimérica, na forma de um eixo axial no interior da célula (**Figura 5**) (BUNN, 1997; NETO; PITOMBEIRA, 2003; SCHECHTER, 2008; SONATI; COSTA, 2008).

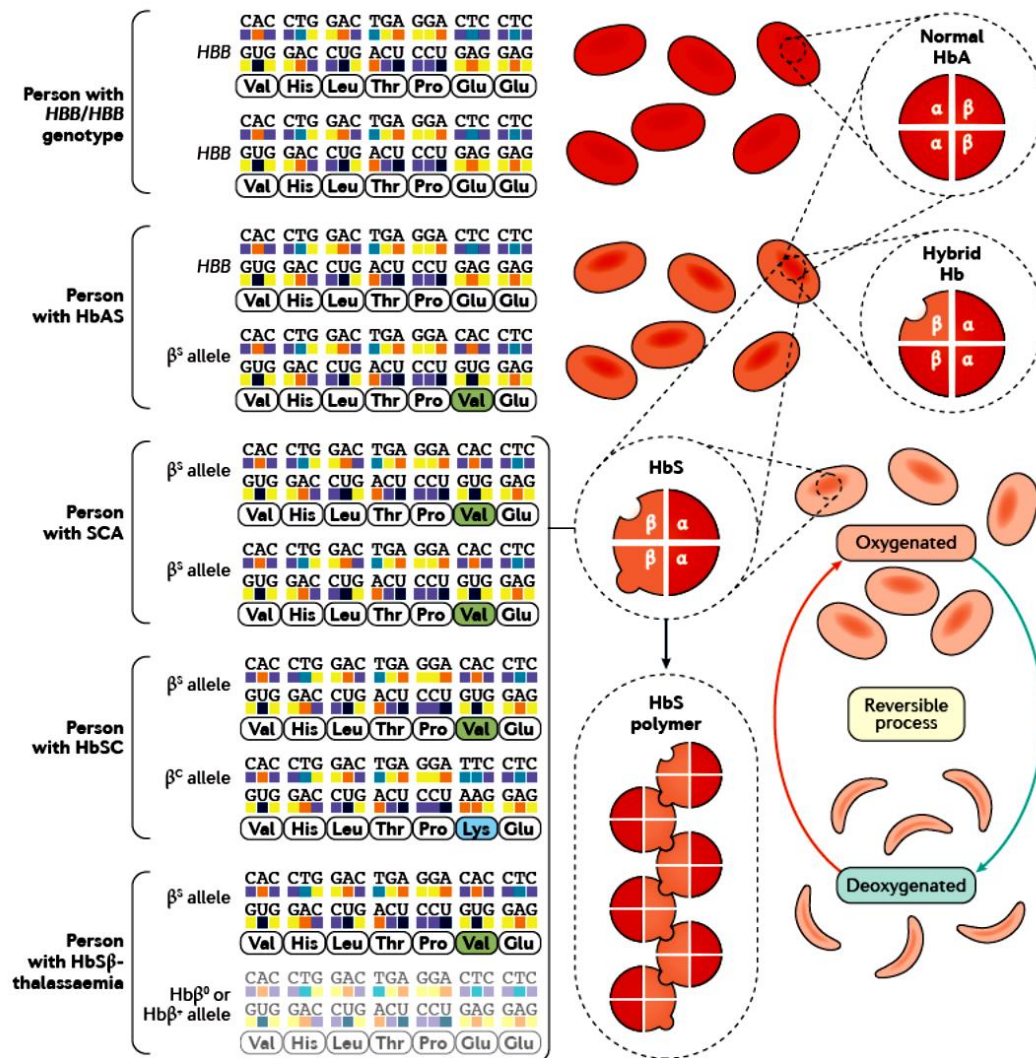


Figura 5: Polimerização da hemoglobina S.
Fonte: Kato et al., 2018.

A doença falciforme é considerada uma desordem genética qualitativa e quantitativa, pois sua patogênese está relacionada com a presença da hemoglobina variante HbS, sua polimerização e consequentemente a falcização dos eritrócitos é altamente dependente da concentração da HbS intra-eritrocitária (COSTA et al., 2015; THEIN, 2013). O termo doença falciforme é um termo genérico usado para determinar um grupo de alterações genéticas caracterizadas pelo predomínio de HbS, isto é, os diferentes genótipos que causam a síndrome clínica característica da doença que varia de moderado a acentuado. Essas alterações incluem a anemia falciforme (AF), que é a forma homocigota da HbS (HbSS), as interações de síndromes talassêmicas com a HbS (HbS-β⁺, HbS-β⁰) e associação com outras hemoglobinas variantes (HbSC, HbS-β⁺, HbS-β⁰, HbSE, HbSD, HbSO). Do ponto de vista clínico a AF é a mais prevalente e com maior gravidade (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; SCHECHTER, 2008; SONATI; COSTA, 2008; STEINBERG, 2009; THEIN, 2013).

1.3 Anemia Falciforme

Os característicos eritrócitos em forma de foice foram primeiramente descritos por James Herrick em 1910, em um paciente negro de 20 anos de idade nascido em Grenada, Ilhas do Caribe, portador de um grave quadro anêmico acompanhado de icterícia, complicações pulmonares e úlceras de membros inferiores (HERRICK, 2001; NAOUM, 1997b; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Após o terceiro caso com esse mesmo quadro e alterações hematológicas ter sido relatado em 1917, cogitou-se a possibilidade dessa doença ser de origem hereditária pelo fato de ter sido encontrado eritrócitos com idênticas deformações no sangue dos pais do paciente (NAOUM, 1997b). Em 1949, Linus Pauling e colaboradores identificaram que a base molecular da anemia falciforme era devido uma hemoglobina anormal, a qual apresentava mobilidade eletroforética diferente da hemoglobina normal devido a mudança de carga da globina (NAOUM, 1997b; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; SCHECHTER, 2008).

A anemia falciforme originou-se na Ásia Menor (atualmente é a parte asiática da Turquia) e se propagou pelas Américas pelo tráfico massivo de escravos ocorrido entre o século XV e metade do século XIX (MOUSINHO-RIBEIRO; CARDOSO; SOUSA, 2008). No Brasil, consiste a hemoglobinopatia mais comum, distribuindo-se de modo heterogêneo e é mais frequente onde a proporção de descendentes africanos é maior (região nordeste e nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais). Foi estimado que aproximadamente 2500 crianças nascidas a cada ano apresentam doença falciforme no Brasil. Cerca de 1 a 6% de 44,66% da população não branca no Brasil, apresentam o gene HbS, favorecendo a propagação da anemia falciforme, a qual passa a ser considerada com um sério problema de saúde (LERVOLINO et al., 2011; MOUSINHO-RIBEIRO; CARDOSO; SOUSA, 2008).

1.3.1 Fisiopatologia e Manifestações Clínicas

O evento no nível molecular da troca de nitrogênio da adenina pela timina (GAG → GTG) no sexto códon do gene da β -globina (β S) levando a uma substituição do ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia polipeptídica induz a alterações celulares e circulatórias que levarão ao quadro característico da anemia falciforme (MANFREDINI; CASTRO; WAGNER, 2007; NAOUM, 1997b). Por causa dessa mutação, o processo de falcização ocorre, o qual consiste na polimerização da HbS, considerada como o evento primário da patogênese da anemia falciforme e seu elemento mais importante é o oxigênio (KATO et al., 2018; STUART; NAGEL; JEFFERSON, 2004). A HbS sofre uma mudança conformacional quando desoxigenada, o que expõe a valina que é apolar na superfície molecular da β S-globina, em vez de ácido glutâmico que é polar. Isso permite interações hidrofóbicas intermoleculares, levando

à formação de polímeros de HbS alongados em fibras helicoidais, que se agrupam para endurecer e induzir a mudança na forma característica das hemácias ao formato de uma foice (BUNN, 1997; GLADWIN; OFORI-ACQUAH, 2014; VINGERT et al., 2014). No entanto, este processo também é influenciado por CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), temperatura, pH do sangue e outras hemoglobinas normais e variantes (MOUSINHO-RIBEIRO; CARDOSO; SOUSA, 2008; SARAF et al., 2014; STUART; NAGEL; JEFFERSON, 2004).

A membrana eritrocitária é fortemente afetada durante a falcização, tornando-se rígida e não deformável (MADIGAN; MALIK, 2006). O processo de desoxigenação induz o aumento da hemoglobina S que tem ferro no estado férrico de Fe^{3+} , superando assim a ação da enzima meta-Hb-redutase dentro do eritrócito. Portanto, a formação de hemicromos e a precipitação de globina S na forma de corpos de Heinz promovem o desalinhamento da banda-3 da membrana eritrocitária. Essas alterações também são caracterizadas por desequilíbrios das proteínas espectrina-actina, diminuição de glicoproteínas, geração de radicais livres oxidantes e orientação anormal dos fosfolípidios, causando deformações na forma de escavações na membrana eritrocitária e uma diminuição acentuada na capacidade de deformação, que levarão a fenômenos circulatórios, como crises vaso-oclusivas, marca registrada da doença (BUNN, 1997; NAOUM, 1997b, 2000; ODIÈVRE et al., 2011; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

As vias de transporte de íons que mantêm a hidratação das hemácias também sofrem mudanças. Os dois sistemas mais importantes são o co-transportador de K^+ / Cl^- e o canal de Gardos (canal dependente de K^+ / Ca^{2+}). Na AF, o primeiro canal é anormalmente ativado, o que permite que K^+ e Cl^- saiam da célula, seguidos de água, o que resulta em desidratação. Isto leva a um aumento da concentração de HbS intracelular que agrava a polimerização. Os eritrócitos SS têm quantidades aumentadas de Ca^{2+} compartmentalizadas em vesículas intracelulares e com concentrações normais de cálcio citosólico no estado estacionário. Quando a membrana celular é distorcida para a forma falciforme durante a desoxigenação, há um aumento transitório de cálcio citosólico o suficiente para ativar o canal de Gardos, que é a bomba de efluxo de K^+ dependente de Ca^{2+} . A cinética do canal de Gardos ainda é alterada pela endotelina, prostaglandina E2 e outras quimiocinas, causando mais efluxo de K^+ e, portanto, desidratação e polimerização da HbS (BUNN, 1997; LEW; BOOKCHIN, 2005; ODIÈVRE et al., 2011).

Repetidos ciclos de falcização, que levam a repetidos processos de hipóxia-reperfusão (oxigenação-desoxigenação), prejudicam ainda mais as membranas dos eritrócitos, alteram também a troca iônica, afetam a permeabilidade celular e, conseqüentemente, encurtam a vida

dos eritrócitos, causando hemólise e anemia crônica. Esse processo pode ser reversível com a oxigenação celular, no entanto, com episódios repetidos, o eritrócito se torna irreversivelmente falcizado (NAOUM, 1997b; SONATI; COSTA, 2008).

O aumento da hemólise intravascular com liberação de hemoglobina e seus produtos de oxidação pode estimular uma inflamação estéril via ativação de heme-TLR4, o que sugere que produtos de hemólise de eritrócitos como o DNA celular e mitocondrial, ácido úrico, adenosina, HMGB1, LDH e outros citoplasmáticos e nucleares as proteínas podem ser consideradas padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs) e, quando eliminados das células após lesão tecidual, necrose celular e outras lesões, ativam a imunidade inata e causam inflamação sistêmica na ausência de infecção (GLADWIN; OFORI-ACQUAH, 2014).

A hipóxia e a anemia hemolítica induzem uma resposta aumentada da medula óssea e, portanto, aumentam a eritropoese, refletida pela alta circulação de reticulócitos (CROIZAT et al., 2000; PERELMAN et al., 2003). A atividade excessiva pode causar infarto da medula óssea nesses pacientes, levando à embolização pela gordura e, portanto, à oclusão vascular, especialmente nos pulmões. Isso pode causar a síndrome torácica aguda, a segunda causa principal de hospitalização de pacientes com HbSS (CHAKRAVORTY; WILLIAMS, 2015b). A hemólise intravascular está associada à fadiga, colelitíase, desenvolvimento de doença vascular progressiva e hipercoagulabilidade na anemia falciforme. A hemoglobina liberada gera espécies reativas de oxigênio, como radicais hidroxila e superóxidos, que eliminam o óxido nítrico (NO). O óxido nítrico, um gás com potente ação vasodilatadora, propriedades antiadesivas e antioxidantes entre os vasoconstritores liberados pelo endotélio, regula o tônus vascular (AGUIAR et al., 2016; ODIÈVRE et al., 2011). A arginase eritrocitária I liberada, que converte a L-arginina, substrato da enzima síntese de NO, em ornitina e reduz a biodisponibilidade de NO (ASLAN; CANATAN, 2008). A depleção de NO está associada à ativação patológica de plaquetas e fator tecidual (GLADWIN; KATO, 2008).

Outras características importantes da fisiopatologia da anemia falciforme no estado estacionário, supostamente secundárias ao fenômeno de falcização, são a leucocitose que ocorre apesar da ausência de infecção ou inflamação aguda e ativação de monócitos, neutrófilos, e células endoteliais. As razões para a presença dessas células ativadas e o aumento da adesão ao endotélio no estado estacionário da doença ainda não foram completamente elucidadas (PERELMAN et al., 2003). O endotélio vascular desempenha um papel crítico na oclusão vascular e no dano tecidual isquêmico por vários mecanismos, tais como: homeostase regulação e tônus vascular, adesão de hemácias e leucócitos. A ativação endotelial é devida ao aumento da expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1, P-selectina e E-selectina e

moléculas pró-coagulantes como fator tecidual, que interagem com moléculas de adesão leucocitárias como as integrinas LFA-1, VLA -4 e Mac-1 (BELCHER et al., 2000).

As principais manifestações clínicas da AF são direcionadas pelos dois principais processos fisiopatológicos que ocorrem na anemia falciforme: vaso-oclusão com lesão de isquemia-reperfusão e anemia hemolítica. Estes incluem crises de dor aguda, crises hemolíticas, úlceras de membros inferiores, sequestro esplênico, priapismo, necrose asséptica do fêmur, retinopatia, insuficiência renal crônica, acidente vascular cerebral, entre outros (CHAKRAVORTY; WILLIAMS, 2015b; NETO; PITOMBEIRA, 2003; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Pacientes com AF durante a sua vida, experimentam ataques súbitos de dor em vários níveis de gravidade. A crise vaso-oclusiva dolorosa é a mais comum e é caracterizada por febre, leucocitose, derrame articular, fraqueza e suscetibilidade a infecções. Os pacientes no estado entre os episódios de crise são chamados de pacientes em estado estacionário (MUSA et al., 2010). Os fenômenos vaso-oclusivos ocorrem principalmente em órgãos com circulação sinuosa, onde o fluxo sanguíneo é lento e a tensão e o pH do oxigênio são baixos (rim, baço, medula óssea). ou naqueles com suprimento de sangue arterial terminal limitado (olhos, cabeça do fêmur). As hemácias e reticulócitos falcizados de pacientes com AF são mais aderentes às proteínas do endotélio vascular e da matriz extracelular, devido à expressão pronunciada de moléculas de adesão, como CD36 e VLA-4 (FRENETTE; ATWEH, 2007; SONATI; COSTA, 2008). A adesão endotelial de leucócitos com formação de agregados heterocelulares (leucócitos e eritrócitos irreversivelmente falcizados) também contribuem para a obstrução, resultando em hipóxia local, aumento na formação de polímeros de HbS e propagação da oclusão da vasculatura adjacente (STUART; NAGEL; JEFFERSON, 2004). Episódios de oclusão microvascular e isquemia são seguidos de restauração fluxo sanguíneo que promove ainda mais dano tecidual mediado pela reperfusão. Os ciclos de isquemia e reperfusão causam estresse oxidativo, com ativação de oxidases vasculares e estresse inflamatório com aumento de citocinas inflamatórias e leucocitose (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

A anemia falciforme deve ser considerada uma doença inflamatória crônica, em que a gravidade das manifestações clínicas seja determinada por um estado pró-inflamatório amplificado e também por marcadores genéticos (BANDEIRA et al., 2014; CHIES; NARDI, 2001).

1.3.2 Interação do Sistema Imune na Fisiopatologia da Anemia Falciforme

A anemia falciforme está associada com um estado pró-inflamatório crônico, caracterizado por uma contagem de leucócitos elevada, mortalidade por graves infecções

recorrentes e subseqüentes complicações vaso-oclusivas como adesão de leucócitos ao endotélio e aumento dos níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias como interleucinas IL-6 e IL-8, os quais contribuem para a patogênese da AF (CHIES; NARDI, 2001; VILAS-BOAS et al., 2015). Indivíduos com AF possuem alta susceptibilidade a infecções, secundária ao comprometimento da função imune (BALANDYA et al., 2017).

Os eventos isquêmicos produzidos por essa oclusão tanto em macro quanto micros vasos envolve intrincadas interações entre hemácias, endotélio e células imunes inatas e adaptativas. Essas interações são reguladas por citocinas secretadas por células T, monócitos ativados assim como por moléculas de adesão e conseqüentemente, a resposta imune está implicada na iniciação e desenvolvimento das crises da anemia falciforme (BANDEIRA et al., 2014; MUSA et al., 2010).

A liberação de heme e outros padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs) devido à hemólise na anemia falciforme ativam o sistema imune inato e esse por sua vez o sistema imune adaptativo. A ligação desses DAMPs nos receptores *Toll-like* TLR4 e TLR2 induz a ativação do inflamassoma NLRP3 em monócitos e macrófagos e com isso a liberação de altos níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-18 dentre outras por outras vias intracelulares. A formação de um inflamassoma pode ocorrer tanto em resposta a ativadores microbianos quanto aos sinais inflamatórios estéreis, cujo papel central é o controle da defesa imune inata do hospedeiro para manutenção homeostática tecidual (CONRAN et al., 2007; MENDONÇA; SILVEIRA; CONRAN, 2016). A ativação do TLR4 nas plaquetas promove sua adesão aos neutrófilos, que, por sua vez, liberam o DNA para formar as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Leucócitos circulantes aderem uns aos outros e ao endotélio ativado, contribuindo e potencialmente até iniciando a vaso-oclusão (BEERS et al., 2014; GLADWIN; OFORI-ACQUAH, 2014; KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017).

Parte da disfunção dos sistema imune inato tem demonstrado incluir aumento da contagem de neutrófilos no sangue periférico (granulocitose), que muitas vezes é responsável pela leucocitose na AF. No entanto, os neutrófilos aumentados são na sua maioria disfuncionais devido à quimiotaxia, migração e capacidade de matar estarem prejudicadas (ANYAEGBU et al., 2010; BALANDYA et al., 2017; HUMBERT et al., 1990). Segundo Brousse et al (2014), a maioria das alterações imunes inatas da AF é uma manifestação da função esplênica reduzida (hipoesplenismo) (BROUSSE; BUFFET; REES, 2014). Estudos epidemiológicos sugerem que os neutrófilos estão envolvidos em acentuada variação de gravidade da doença falciforme. Monócitos e células iNKT possuem um papel chave na vaso-oclusão; inflamação e disfunção pulmonar em pacientes com AF (ZHANG et al., 2016).

A interação de neutrófilos e monócitos na fisiopatologia da AF são mais descritos na literatura (HAYNES et al., 2019; LARD et al., 1999; LIU et al., 2018; PERELMAN et al., 2003; WUN et al., 2002). Estudos limitados mostram o envolvimento das outras células inatas, como subtipos de células dendríticas, células NK e NKT. O heme liberado dos eritrócitos durante a hemólise limita a expressão do marcador de maturação CD83 nas células dendríticas de pacientes com AF não aloimunizados, por meio da via mediada pelo receptor TLR4 envolvendo NF- κ B, diminuindo as respostas inflamatórias nesses indivíduos, porém essa via é defeituosa nos pacientes aloimunizados (GODEFROY et al., 2016). As células NKT medeiam inflamação e disfunção pulmonar em modelo murino de doença falciforme por meio da produção de IFN- γ e quimiocinas CXCR3. Nesse mesmo modelo foi mostrado que ativação de receptor de adenosina A_{2A} das células iNKT e NK é suficiente para melhorar a função pulmonar basal e prevenir a exacerbação da injúria pulmonar induzida pelo processo de hipóxia-reoxigenação (WALLACE et al., 2019)

Estudos limitados realizados até agora indicaram anormalidades no sistema imune adaptativo em indivíduos com SCA. Algumas anormalidades como redução na proporção de células TCD4⁺ e TCD8⁺ circulantes e disfunção de células T reguladoras ocorrem concomitantemente ao aumento da ativação imunológica e podem afetar a reatividade da vacina em indivíduos com AF. Contudo, atualmente pouco foi feito para caracterizar o fenótipo, função e contribuição dos linfócitos T e B para doenças inflamatórias crônicas na AF (BALANDYA et al., 2017).

Chies e Nardi (2001) relatam que pacientes “saudáveis” com DF comparados a indivíduos saudáveis controles possuem níveis circulantes equivalentes de citocinas Th1, tais como IL-2 e IFN- γ em ambos sujeitos saudáveis com AF e controles saudáveis, e níveis circulantes mais altos de citocinas Th2, como IL-4 e IL-10 foram mais frequentemente observados em DF saudáveis do que em controles saudáveis normais. Como todas as análises foram feitas em indivíduos saudáveis, esses dados podem ser interpretado da seguinte forma: pacientes com DF considerados como "saudáveis" são aqueles com um perfil de citocinas Th2, enquanto que em indivíduos com DF cujo sistema imunológico é direcionado a padrão Th1, ocorrerão reações inflamatórias levando a sintomas clínicos e caracterização da doença. Em outras palavras, indivíduos propensos a Th1 poderiam refletir uma população mais suscetível a desenvolver manifestações clínicas graves de DF mostrando conseqüentemente maior morbidade (CHIES; NARDI, 2001). No entanto, esses achados são contraditórios, pois Bandeira e colaboradores (2014) mostraram o envolvimento das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-17 apenas

em pacientes com AF no estado estacionário, frente aos diferentes haplótipos (BANDEIRA et al., 2014).

As plaquetas, caracteristicamente elevadas na anemia falciforme, além de papel crucial na coagulação e homeostase, parecem ter papel fundamental na regulação das células imunes, incluindo neutrófilos, monócitos, linfócitos T e B e células dendríticas (KI et al., 2017), porém a contribuição dessa modulação para o progresso da doença precisa ser mais investigada.

O sistema imune tem uma relação estreita com o equilíbrio entre saúde e morbidade na anemia falciforme (CHIES; NARDI, 2001; MUSA et al., 2010). No entanto, as informações sobre esse envolvimento ainda são escassas e divergentes quanto ao perfil de resposta que prevalece nos estados estacionário e crise vaso-oclusiva, quanto a participação de células inatas e adaptativas nessa modulação, quanto a associação desses componentes imunes com os parâmetros laboratoriais e gravidade clínica da AF. Portanto, são necessários mais estudos sobre o envolvimento da imunidade inata e adaptativa no desequilíbrio da AF, o que permitirá otimizar o desenvolvimento de vacinas e outros alvos terapêuticos.

1.4 Diagnóstico Laboratorial e Tratamento das Doenças Falciformes

Os objetivos e métodos de diagnóstico de doenças falciformes variam de acordo com a idade da pessoa. Em geral, existem quatro períodos de teste: pré-concepção, pré-natal, neonatal e pós-neonatal. O teste de pré-concepção é projetado para identificar pais potenciais assintomáticos cuja descendência oferece risco de DF (KATO et al., 2018). O diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias falciformes para testes de pré-concepção são métodos rotineiros básicos baseados na análise da hemoglobina e da sua associação com outras frações por meio de técnicas eletroforéticas em pH alcalino (8 a 9) ou em pH ácido (5 a 6,5) em acetato de celulose ou agarose, hemograma e dosagens de hemoglobina fetal, os quais são técnicas de baixo custo e viáveis no mundo todo (ANVISA, 2001; KATO et al., 2018). Apesar de atualmente alguns laboratórios também utilizarem as técnicas de biologia molecular e espectrometria de massa (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

A eletroforese em pH alcalino permite análises qualitativas e quantitativas das frações. A existência de outras hemoglobinas mutantes, ou seja, associações da HbS com outras variantes de hemoglobina (HbD, HbC, HbS/ β^0 , HbS/ β^+ , HbS/ α), o traço falciforme (HbAS) e anemia falciforme associada à persistência hereditária de hemoglobina fetal (HbS/PHHF), as quais podem imitar as características eletroforéticas da HbS, obriga ao uso de mais um método de análise, para assegurar que a hemoglobina anormal observada é a HbS. Métodos simples como teste de falcização e prova de solubilidade, os quais apresentam pouca sensibilidade e

reprodutibilidade acusando apenas a presença ou ausência de HbS, e a eletroforese ácida em ágar, podem ser utilizados para esse fim. Essas técnicas conferem um correto diagnóstico genotípico da doença falciforme, quando aplicado em conjunto com as informações de história e exame físico, contagens automatizadas das células sanguíneas (Hb, Hct e VCM) e análise do esfregaço do sangue periférico com atenção especial à morfologia eritrocitária para se chegar a um resultado seguro (ANVISA, 2001).

O diagnóstico pré-natal é geralmente seguro, mas é um procedimento invasivo e oferecido durante a gravidez precoce para casais que tiveram teste positivo na triagem pré-concepção. Requer amostras de DNA fetal obtidas de vilosidades coriônicas a qual é realizada com 9 semanas de gestação (HOPPE, 2013). Triagem neonatal para DF é realizada no nascimento antes que os sintomas ocorram, usando metodologias de análise da Hb. A necessidade do teste pós-neonatal para DF é influenciada por vários fatores que afetam o conhecimento da população em geral se possui ou não DF. Esses fatores incluem o sucesso regional de programas de triagem neonatal, imigração de pacientes em risco não previamente testados e acesso a resultados neonatais em pacientes mais velhos. O conhecimento de ser portador de HbAS é importante na prevenção de doenças graves complicações e para o planejamento familiar (KATO et al., 2018).

Ainda não há tratamento específico das doenças falciformes, consistindo apenas de paliativos para controlar as complicações clínicas que acometem os portadores da doença. São adotadas medidas gerais e preventivas na terapêutica desses pacientes, no sentido de minorar as consequências da anemia crônica, crises de falcização e susceptibilidade às infecções. Essas medidas incluem boa nutrição; profilaxia, diagnóstico e terapêutica precoce de infecções; manutenção de boa hidratação e evitar condições climáticas adversas. Além disso, acompanhamento ambulatorial 2 a 3 vezes ao ano e educação da família e paciente sobre a doença são auxiliares na obtenção de bem-estar social e mental (ANVISA, 2001; BRASIL, 2014).

Em 1998, a hidroxiuréia tornou-se a única terapia para doenças falciformes aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos. Primeira descrita como potencial terapia em 1984, a hidroxiuréia aumenta a produção de hemoglobina fetal nos eritrócitos falcizados (FIELD; NATHAN; NOEL, 2014). A terapia com hidroxiuréia pode reduzir episódios dolorosos, tempo de internação e número de transfusões e poderia reduzir em 50% a ocorrência de novos episódios de síndrome torácica aguda (SILVA-PINTO et al., 2013). Contudo, a hidroxiuréia é uma droga que inibe a redutase difosfato ribonucleotídeo, enzima que converte ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, os quais são essenciais para síntese e

reparo do DNA. Consiste num agente citotóxico e antineoplásico que afeta especificamente a fase S e interrompe o ciclo celular nas fases S e G2. Apesar de ter reduzido a gravidade das consequências das doenças falciformes, 3 casos de AF desenvolveram leucemia aguda após 6 e 8 anos de tratamento. Portadores de AF que fizeram terapia com hidroxiuréia apresentam altos níveis de danos no DNA em relação a pessoas saudáveis (FRIEDRISCH et al., 2008).

Embora, a hidroxiuréia tenha sido um grande avanço terapêutico, tratamentos adicionais são certamente necessários. Até 50% dos pacientes não se beneficiará da hidroxiuréia a longo prazo devido à má resposta e toxicidade. Com subdose da hidroxiuréia a expectativa de vida dos pacientes com doenças falciformes permanece em torno dos 50 anos (FIELD; NATHAN; NOEL, 2014).

Outras abordagens terapêuticas são adotadas para aliviar os sintomas como a analgesia, transfusão sanguínea e uso de antibióticos (PULE; WONKAM, 2014). A dor aguda é a razão mais comum para admissão hospitalar tanto em adultos quanto em crianças. Frequentes episódios de dor aguda estão associados com anemia, hematócrito alto, baixa concentração de hemoglobina fetal, asma, hipoxemia noturna levando a oclusões intermitentes da microcirculação. O tratamento dessas crises implica em eliminar esses fatores precipitantes, repouso, hidratação adequada e analgesia (aspirina, acetaminofeno, propoxifeno, codeína e até mesmo morfina em dores graves) (STUART; NAGEL; JEFFERSON, 2004).

As transfusões sanguíneas, especificamente de bolsas de concentrados de hemácias, têm um papel estabelecido no gerenciamento tanto das complicações agudas quanto crônicas nas doenças falciformes. São indicadas para corrigir exacerbação aguda da anemia devido aos sequestros esplênico ou hepático, ou severa vaso-oclusão; situações que para serem revertidas precisam que ocorra a diminuição da percentagem de HbS ou a supressão da síntese de HbS, como síndrome torácica aguda, acidente vascular encefálico ou déficit neurológico agudo e falência de múltipla de órgãos (OSARO; ADIAS, 2011). No entanto, vários efeitos adversos potenciais, incluindo sobrecarga de ferro, aloimunização e reações transfusionais hemolítica, limitam esses benefícios da transfusão sanguínea (KATO et al., 2018).

A sobrecarga de ferro é a mais problemática para aqueles que recebem transfusões crônicas e é revertida com a terapia de quelação para evitar complicações endócrinas, hepáticas e cardíacas. A aloimunização continua a ser a principal complicação associada a transfusões de concentrados de hemácias em pacientes com doença falciforme e podem estar associadas com reações transfusionais retardadas com ou sem hemólise evidente. Alo e auto anticorpos podem aumentar a complexidade dos testes de compatibilidade e pode retardar o recebimento do sangue compatível (CHOU, 2016). Embora útil e eficaz nessas circunstâncias, a transfusão de

sangue por si só não é suficiente para tratamento das doenças falciformes e não é curativa (PULE; WONKAM, 2014).

O transplante de células tronco e a terapia gênica provavelmente se tornem as técnicas mais aplicáveis. Porém, o transplante de células tronco hematopoiéticas é recomendado para crianças a partir de um doador com HLA idêntico e não é ainda padrão para adultos com doença falciforme (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Quanto à terapia gênica, há um longo caminho entre os benefícios potenciais e reais para as doenças falciformes. Até o momento não há dados efetivos sobre riscos e benefícios sobre essa prática para tratamento das doenças falciformes (OLOWOYEYE; OKWUNDU, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Descrever o perfil imune fenotípico associado a parâmetros laboratoriais e gravidade clínica da anemia falciforme.

2.2 Específicos

- Identificar o perfil fenotípico de células das imunidades inata e adaptativa envolvidas na resposta inflamatória da anemia falciforme em estado estacionário;
- Descrever citocinas e quimiocinas inflamatórias e regulatórias e fatores de crescimento em pacientes com anemia falciforme em estado estacionário;
- Associar o perfil fenotípico celular, citocinas/quimiocinas/fatores de crescimento aos parâmetros laboratoriais e a gravidade clínica da anemia falciforme;
- Identificar biomarcadores celulares e/ou solúveis associados a parâmetros laboratoriais e gravidade clínica da anemia falciforme em estado estacionário.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipo de Estudo

Foi realizado um estudo observacional transversal em pacientes diagnosticados com anemia falciforme (homozigotos, HbSS), para identificar o perfil imune fenotípico funcional associado a parâmetros laboratoriais e gravidade clínica da anemia falciforme.

3.2 População de Estudo

Os dados dessa pesquisa foram obtidos a partir dos seguintes segmentos populacionais:

- I) Pacientes com anemia falciforme em estado estacionário que procuraram a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-HEMOAM para atendimento ambulatorial de rotina no período de Março de 2017 a Janeiro de 2018, localizada na cidade de Manaus, Estado do Amazonas.
- II) Para o grupo controle, denominado grupo de doadores saudáveis, foram selecionados ao acaso candidatos a doação de sangue na Fundação HEMOAM.

3.3 Participantes do Estudo

A amostragem foi composta 70 doadores de sangue, de ambos os gêneros (18 feminino e 52 masculino), com idade variando de 20 a 61 anos ($32 \pm 10,6$), abordados após passarem pela triagem e quando estavam na sala de doação e por 30 pacientes com anemia falciforme em estado estacionário, de ambos os gêneros (20 feminino e 10 masculino), com idade variando de 18 a 49 anos ($30 \pm 8,9$), coletados por demanda espontânea durante atendimento médico na fundação HEMOAM.

3.4 Critérios de Inclusão e Exclusão

Os critérios de inclusão adotados foram: Indivíduos de ambos os sexos, atendidos no HEMOAM, com idade igual ou acima de 18 anos, que sejam homozigotos para doença falciforme (HbSS) e estejam em estado estacionário. Os critérios utilizados para exclusão foram: Mulheres grávidas, indígenas, presença de outras doenças hematológicas (leucemia e outras anemias), estejam ou que fizeram recente tratamento para câncer; e doenças inflamatórias e infecciosas como malária, dengue, doença de Chagas, micoses, Zika, Chikungunya, pneumonia, faringite, amigdalite e bronquite.

3.5 Aspectos Éticos

O projeto intitulado: “*Biomarcadores celulares e solúveis associados a parâmetros laboratoriais e gravidade clínica da anemia falciforme*” foi aprovado pelo Comitê de Ética em

Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM) com número de CAAE 56413316.9.0000.0009 (**Anexo I**)

3.6 Procedimentos

3.6.1 Coleta de Dados e Amostra Biológica

A coleta de dados e amostra biológica foram realizadas na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM, onde os indivíduos do grupo controle foram abordados após passarem pela triagem e quando estavam na sala de doação e os pacientes foram abordados quando estavam em atendimento médico na fundação. Os mesmos foram convidados a participar da pesquisa e assinar em seguida o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). No dia da coleta de sangue dos pacientes, foi aplicado um questionário estruturado, com os seguintes itens: Número de identificação, nome do candidato, sexo, idade, local de nascimento e origem; dados sobre a sintomatologia da doença, tipos de infecções, uso de medicamentos, número de transfusões. Os dados obtidos nos questionários, no hemograma e na citometria de fluxo, foram armazenados em planilha de dados tipo *Excel*, para realização das análises.

A amostra de sangue periférico foi coletada por punção venosa, aproximadamente 12mL, em tubos contendo EDTA (*BD Vacutainer® EDTA K2*) e gel separador (*BD Vacutainer® gel*, para a realização do Hemograma e Citometria de Fluxo, dosagem de citocinas séricas, respectivamente.

3.6.2 Testes Hematológicos

Para a avaliação hematológica foram realizados a contagem global dos leucócitos totais e diferencial, das células vermelhas (hemácias), das plaquetas, a determinação do hematócrito, dosagem de hemoglobina e índices hematimétricos e reticulócitos por meio do contador hematológico ADVIA 2120i da Siemens.

3.6.3 Imunofenotipagem celular *ex vivo* por Citometria de Fluxo

As células foram obtidas de uma alíquota de 100µL de sangue periférico coletado em tudo com EDTA como anticoagulante. Para a caracterização imunofenotípica foi realizada a técnica de Citometria de Fluxo.

As células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorescências que se fixam em epítomos específicos os quais são captados pelo Citômetro de Fluxo para a caracterização das populações celulares. Neste estudo utilizamos um painel de anticorpos

monoclonais marcados, divididos em 17 tubos para a quantificação e caracterização das seguintes populações celulares:

- Linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺: anti-CD3FITC/CD8PE/CD4PercP/CD69APC;
- Células Tregs: anti-CD4FITC/CD25PercP/FoxyP3 AF647;
- Células B e B1: anti-CD5FITC/CD19PE;
- Células NK e NKT: anti-CD16FITC/CD56PE/CD3PercP/CD69APC;
- Células Dendríticas Clássicas e Plasmocitoides: anti-CD123FITC/CD11cPE;
- Subtipos de Monócitos: anti-CD14FITC/CD80PE/CD16PercP/HLA-DR APC;
- TLR2 em Monócitos e Neutrófilos: anti-CD14+ CD282PE;
- TLR4 em Monócitos e Neutrófilos: anti-CD14FITC/CD284PE;
- TLR9 em Monócitos e Neutrófilos: anti-CD14FITC/CD289PE;
- Mac-1 em Linfócitos TCD4⁺: anti-CD4FITC/CD11bPE/CD3PercP;
- Mac-1 em Linfócitos TCD8⁺: anti-CD8FITC/CD11bPE/CD3PercP;
- VLA-4 em Linfócitos TCD4⁺: anti-CD4FITC/CD49dPE/CD3PercP;
- VLA-4 em Linfócitos TCD8⁺: anti-CD8FITC/CD49dPE/CD3PercP.

Inicialmente foi realizado um pool com os anticorpos específicos para cada tubo em volume adequado de PBS-wash (com albumina) de acordo com o número de amostras. Para marcação incubou-se 100µL de sangue total nos tubos 1-15 com 10µL dos pools de anticorpos e 200µL de sangue nos tubos 16 e 17 com 20µL dos pools de anticorpos nos seus respectivos tubos. Estes foram homogeneizados no vórtex e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a marcação, foi feita a lise das hemácias com o uso da solução de lise (*BD FACSTM Lysing Solution, Cat. N° 349202, Lot.: 24299, BD® Biosciences San Jose, CA, USA*), diluída 10 vezes em água destilada. Os tubos foram novamente homogeneizados e incubados por 10 minutos nas mesmas condições. Passado a fase de incubação, os tubos foram centrifugados a 1500rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 2 mL de PBS-wash (8,0g de NaCl, 1,16g de Na₂HPO₄, 0,2g de KH₂PO₄, 0,2g de KCl e 5,0g de BSA, qsp 1L H₂O destilada, pH: 7,2) para lavagem do precipitado formado. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados novamente. Após a centrifugação, o

sobrenadante foi descartado e adicionado 300µL de PBS-wash nos tubos 1-15, e armazenados em geladeira até o momento da leitura.

Aos tubos 9, 16 e 17, foram adicionados 150µL de PBS-P (8,0g de NaCl, 1,16g de Na₂HPO₄, 0,2g de KH₂PO₄, 0,2g de KCl, 5,0g de BSA e 5,0g de Saponina, qsp 1L H₂O destilada, pH: 7,2) para permeabilização celular, 10µL de anticorpo anti-FoxP3 AF647 (*Alexa Fluor 647, Cat. N° 560015, lote 68982, clone 259D/C7, marca BD® Biosciences, San Diego, CA, USA*) no tubo 17 e 3µL do anticorpo anti-CD289 PE (Ficoeritrina, *lote: E05895-1630110916 PE, marca Novus*) no tubo 9. Os tubos foram homogeneizados novamente e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida os tubos foram centrifugados a 1500rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 2mL de PBS-wash para lavagem do precipitado formado. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados novamente. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 300µL de PBS-wash e armazenados na geladeira até o momento da leitura.

A aquisição das amostras foi realizada no Citômetro de Fluxo *FACSCalibur® (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA)* da Fundação HEMOAM. Para a identificação morfológica e imunofenotípica das células utilizou-se o programa *FlowJo (v7.2)*, com o auxílio de “*gates*” para a seleção das populações de interesse em gráficos que combinam características morfológicas (tamanho e granulidade) com características imunofenotípicas através das fluorescências dos anticorpos monoclonais utilizados para identificar as células alvos. Os gráficos utilizados foram do tipo “*pseudocolor*” e histograma, pois apresentaram uma melhor visualização das estratégias de análise.

3.6.4 Dosagem de Citocinas, Quimiocinas e Fatores de Crescimento por Ensaio Luminex.

As citocinas séricas IFN- γ , IL-12, IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-7, IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, IL-17 e 10, as quimiocinas IL-8, IP-10, MIP- α , MIP- β , MCP-1 e RANTES e os fatores de crescimento VEGF, bFGF, PDGF, GM-CSF e G-CSF foram mensuradas com o kit *Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex kit (Bio-Rad, Califórnia, EUA)* seguindo as instruções do fabricante por meio do ensaio Luminex. A aquisição e análise de dados foi realizada utilizando o equipamento *Luminex 200 System* e o software *Bioplex Manager*, respectivamente, no Instituto Renè Rachou/Fiocruz-Minas. Os resultados foram expressos como pg/mL, conforme avaliado pela curva padrão usando o parâmetro de regressão quinto-logística. Os limites de detecção foram IFN- γ = 25,411 pg/mL; IL-12 = 37,684 pg /mL, IL-1 β = 8,608 pg /mL, TNF- α = 64,803 pg /mL, IL-2 = 18,297 pg /mL, IL-7 = 16,593 pg /mL, IL-4 = 4,789 pg /mL, IL-5 = 23,105 pg /mL, IL-13 = 8,090 pg /mL, IL-6 = 37,680 pg /mL, IL-17 = 28,850 pg /mL, IL-10 =

35,170 pg /mL, IL-8 = 42,150 pg /mL, IP-10 = 31,236 pg /mL, MIP- α = 960 pg /mL, MIP- β = 11,233 pg /mL, MCP-1 = 24,282 pg /mL, RANTES = 16,533 pg /mL, VEGF = 29,464 pg /mL, bFGF = 16,046 pg /mL, PDGF = 24,721 pg /mL, GM-CSF = 12,844 pg /mL, G-CSF = 40,049 pg /mL.

3.7 Análise de Dados e Estatística Convencional

Todos os dados foram considerados como apresentando distribuição não paramétrica e, portanto, as análises comparativas sobre a frequência de células e níveis de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento foram comparadas entre os grupos controle (HD) e pacientes (SCA) pelo teste de *Mann Whitney* bicaudal. Análises entre os subgrupos baixo (low) e alto (high) foram realizadas utilizando-se a análise de variância ANOVA seguida do teste de *Kruskal-Wallis* seguido do teste de comparação múltipla de *Dunn*. Utilizou-se intervalo de confiança de 95% e os dados considerados com significância estatística foram aqueles com valor de $p < 0,05$. O software GraphPad Prism versão 5.0 (San Diego, CA, EUA) foi utilizado para análise de dados.

A escolha dos subgrupos de anemia falciforme baseou-se na importância clínica da hemólise (reticulócitos), hemostasia e inflamação (plaquetas) e complicações clínicas inerentes à fisiopatologia da anemia falciforme. A associação de reticulocitose (contagem de reticulócitos acima de $96 \times 10^3/\text{mm}^3$) e trombocitose (contagem de plaquetas acima de $400 \times 10^6/\text{mm}^3$) na gravidade clínica dessa doença foi demonstrada em estudos anteriores. As categorizações desses subgrupos foram realizadas pelo software GraphPad Prisma versão 5.0 (San Diego, CA, EUA), utilizando-se análise descritiva estabelecendo percentil mínimo de 25%, mediana e percentil máximo de 75%. Considerando que todos os pacientes apresentam reticulocitose e trombocitose, classificamos como baixa (abaixo da mediana) e alta (acima da mediana). A mediana dos reticulócitos foi de $400 \times 10^6/\text{mm}^3$ e das plaquetas foi de $450 \times 10^6/\text{mm}^3$. O risco de morte, conforme calculado pela "Calculadora de Gravidade da Doença Falciforme", disponível em <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects> citado por Belini Junior et al. (2015) (BELINI JUNIOR et al., 2015) para cálculo dos escores de gravidade e classificação dos pacientes em categorias por fenótipo (leve, intermediário, grave). No entanto, não usamos a classificação usada por Belini Junior et al. (2015), pois a população de pacientes seria classificada como 4/30 como intermediária e 26/30 como grave, o que impossibilitaria a segregação dos pacientes pela análise estatística robusta. Portanto, o critério do escore mediano de gravidade (0,670, 67%) foi escolhido para classificar os pacientes como mais e menos graves, com 15/30 com baixa gravidade ($< 0,670$) e 15/30 com maior gravidade ($> 0,670$).

3.8 Análise da Assinatura de Biomarcador

As assinaturas ascendentes de biomarcadores celulares e séricos foram montadas como relatado anteriormente por Luiza-Silva e colaboradores (LUIZA-SILVA et al., 2011). Este modelo de análise permite converter medidas de parâmetros quantitativos em uma análise categórica de células baixas e altas, citocinas / quimiocinas / fatores de crescimento produtores. Inicialmente, todo o universo de dados de cada tipo de célula, citocina, quimiocina e fator de crescimento foi utilizado para calcular o valor mediano global utilizado como ponto de corte para classificar os pacientes com AF e doadores saudáveis em contagens “baixas” ou “altas”. de um dado biomarcador. Os pontos de corte de 50% foram usados para categorizar cada sujeito como apresentando níveis “baixos” ou “altos”. As assinaturas ascendentes foram montadas com sobreposições gráficas do grupo controle com grupo de pacientes e subgrupos de reticulocitose, trombocitose e risco de morte “baixo vs. alto”. Dados relevantes (> 50%) foram então destacados por retângulos cinza na parte inferior do gráfico. O software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, EUA) foi usado para artes gráficas.

3.9 Análise da Rede de Biomarcadores

As redes de biomarcadores foram montadas para avaliar as múltiplas associações entre as células e citocinas/quimiocinas/fatores de crescimento em pacientes e subgrupos com AF. A associação entre os níveis quantitativos de células, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento foi realizada pelo coeficiente de correlação de *Spearman* no software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, EUA) e a significância estatística foi considerada apenas se $p < 0,05$. Depois de realizar a análise de correlação entre os biomarcadores, foi criado um banco de dados no programa Microsoft Excel 2010. Em seguida, as correlações significativas foram compiladas usando o software de acesso aberto Cytoscape (versão 3.6.1), conforme relatado anteriormente. As redes de biomarcadores foram construídas usando um formato circular para cada célula, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, incluindo círculos brancos para grupo controle, círculos pretos para o grupo de pacientes com AF, cinza claro para subgrupos de AF “baixo” e cinza escuro para subgrupos “alto” montados em layouts circulares. Os índices de correlação (r) foram utilizados para categorizar a força de correlação como negativa ($r < 0$), moderada ($0,36 \leq r \leq 0,68$) e forte ($r > 0,68$) representada pelas bordas como proposto por Taylor et al (TAYLOR, 1990).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO I:

Research Article: Sickle Cell Anemia Patients display an Intricate Cellular and Serum Biomarker Network Highlighted by TCD4+CD69+ Lymphocytes, IL-17/MIP- β , IL-12/VEGF and IL-10/IP-10 Axis.

ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO NA REVISTA

Journal of Immunology Research (ISSN: 2314-7156)

<https://doi.org/10.1155/2020/4585704>

E-MAIL DE PUBLICAÇÃO (ANEXO II)

ARTIGO PUBLICADO (ANEXO III)

Nadja Pinto Garcia^{1,6}, Alexander Leonardo S. Júnior³, Geyse Adriana S. Soares², Thainá Cristina C. Costa³, Alicia Patrine C. dos Santos², Allyson Guimarães Costa^{1,3,6}, Andréa Monteiro Tarragô⁶, Rejane Nina Martins⁶, Flávia do Carmo Leão Pontes⁶, Emerson Garcia de Almeida³, Erich Vinícius de Paula^{3,4}, Olindo Assis Martins-Filho⁵, Adriana Malheiro^{1,3,6}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 69077-000 Manaus, AM, Brazil.

² Programa de Apoio a Iniciação Científica, Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM); 69050-001 Manaus, AM, Brazil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia, Universidade Estadual do Amazonas-PPCAH/UEA, 69065-001 Manaus, AM, Brazil.

⁴ Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil.

⁵ Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou/FIOCRUZ-MINAS, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil.

⁶ Laboratório de Genômica, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), 69050-001 Manaus, AM, Brazil.

Abstract

Background. Sickle cell anemia (SCA) is associated with a chronic pro-inflammatory state characterized by elevated leukocyte count, mortality from severe recurrent infections, and subsequent vaso-occlusive complications with leukocyte adhesion to the endothelium and increased plasma levels of inflammatory cytokines. The immune system has a close connection with morbidity in SCA, but further studies are needed to uncover the involvement of innate and adaptive immunities in modulating the SCA physiopathology. We performed the frequency of innate and adaptive immunity cells, cytokines, chemokines and growth factors measurement, toll-like receptors and adhesion molecules expression in the blood of SCA patients and healthy donors to evaluate the different profile of these biomarkers, the relationship among them and its correlation to laboratory records and death risk. *Material and Methods.* Immunophenotyping of cells, Toll-like receptors, adhesion molecules were performed from peripheral blood samples from SCA patients and healthy donors by flow cytometry and cytokine/chemokine/growth factors measurement by luminex technique performed from serum of same subjects. *Results.* Cells of the adaptive immunity, IL-12, IL-17 and IL-10 cytokines, IL-8, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES chemokines and VEGF, FGF-basic and GM-CSF growth factors were higher in SCA patients than healthy donors regardless any laboratorial and clinical condition. Although, high death risk appears to have relevant biomarkers. *Conclusion.* In the SCA pathophysiology at steady state there are a broad immunological biomarker crosstalk highlighted by TCD4+CD69+ lymphocytes, IL-12 and IL-17 inflammatory and IL-10 regulatory cytokines, MIP-1 α , MIP-1 β and IP-10 chemokines and VEGF growth factor. High expression of TLR2 in monocytes and VLA-4 in TCD8+ lymphocytes and high levels of MIP-1 β and RANTES appears to be relevant in high death risk condition. The high reticulocytosis and high death risk conditions present commons correlations there seems to be balance by Th2 profile.

1 Introduction

Sickle cell anemia is the most common hemoglobinopathy (> 70% of sickle cell disease in the world) and the most severe form resulting from the homozygous inheritance a point mutation of adenine replaces by thymine (GAG → GTG) in the sixth codon of β -globin gene (β^S), with valine replacing glutamic acid at the sixth position of the polypeptide chain reflecting in an abnormal form of hemoglobin (HbS) [1–3].

It is estimated that each year 300.000 children are born with severe form (homozygotes) worldwide, mainly in sub-Saharan Africa, the Middle East and India. Migration patterns led the distribution of the sickle cell gene to non-endemic areas of malaria, such as areas in Europe and the USA. In Brazil in 2016, 1.071 newborn babies had sickle cell disease (SCD) and > 60.000 were heterozygous for the β^S allele. There are an estimated 30.000 individuals with SCD in the whole country [4–6] and the prevalence of heterozygotes for HbS in the North and Northeast regions, is higher, about 6 to 10%, while in the South and Southeast the prevalence is lower, 2 to 3% [7,8].

Sickle cell anemia is associated with a chronic pro-inflammatory state characterized by elevated leukocyte count, mortality from severe recurrent infections, and subsequent vaso-occlusive complications such as leukocyte adhesion to the endothelium and increased plasma levels of inflammatory cytokines [9,10]. Although patients have the same genetic mutation for HbS, SCA is characterized by a very heterogeneous clinical course, ranging from patients who have normal life expectancy with relatively few complications such as pulmonary hypertension, priapism, stroke, leg ulceration, recurrent painful episodes, acute chest syndrome (ACS) and avascular necrosis of bone [11–13]. This variability can partly be explained by genetic modifiers, including factors that affect HbF level and co-inheritance of α -thalassaemia or yet environmental factors [9,13–15]. The immune system has a close connection with morbidity in sickle cell anemia, but further studies are needed to uncover the involvement of innate and adaptive immunities in modulating the SCA physiopathology [9,14].

The main events of the SCA physiopathology are hemolysis and vaso-occlusive painful crises due to the complex phenomenon of HbS polymerization essential for the occurrence of SCA. This phenomenon alters the typical lipid bilayer and proteins of erythrocytes membrane, which leads cellular hydration reduce, changes the shape and physical properties of erythrocytes. All these changes will result in hemolytic anemia, abnormal interactions with other blood cells, early erythrocyte apoptosis and blockage of blood flow, particularly in small (and some large) vessels, which leads to repeated hypoxia-reperfusion (oxygenation-deoxygenation) processes further damage any organ [16,17]. The highly unstable of sickle erythrocytes reduce lifespan to $\geq 75\%$ which induces an increased response of bone marrow and therefore increased erythropoiesis, reflected by the high circulation of reticulocytes, which account for $\sim 20\%$ of the red blood cells in individuals with SCA [15,18]. Hemolysis is thought to occur principally via extravascular phagocytosis by macrophages, but a substantial fraction occurs intravascular hemolysis [15,19]. The release of erythrocytes content into plasma by intravascular hemolysis interferes incisively on vasculopathy with involvement of coagulation and immune system components [15].

Vasoconstriction and vascular remodeling in SCA patients, especially in the lung, are mainly caused by nitric oxide (NO) depletion. The decrease of NO bioavailability is caused by Hb (hemoglobin) that scavenges NO, enzyme NO synthase (NOS) inhibition by asymmetric dimethylarginine (ADMA) and by L-arginine depletion, the substrate of NOS, by arginase 1 enzyme. The NO deficiency promote platelet activation and activation of blood clotting proteins [15,20].

Heme and other danger-associated molecular pattern (DAMPs) molecules released from erythrocytes activated the innate immune system. Ligand-bound toll-like receptor 4 (TLR-4) and TLR-2 activate monocytes and macrophages to release inflammatory cytokines, which promote an inflammatory state and activation of endothelial cells. TLR-4 activation on platelets promotes their adhesion to neutrophils, which in turn release DNA to form neutrophil

extracellular traps (NETs). Circulating blood cells adhere to each other and to the activated endothelium, contributing and potentially even initiating vaso-occlusion [21–23].

Limited studies conducted thus far have indicated adaptive abnormalities in individuals with SCA. Some abnormalities like reduction in the proportion of circulating CD4+ and CD8+ T cells and dysfunction of regulatory T cells occur concurrent with increased immune activation and may affect vaccine reactivity in individuals with SCA [24–27]. It is possible that geographical differences in the immune system function may also occur between SCA population [27].

Considering the divergent information about the complex immune response on the progression of SCA, in this study we proposed to explore the role of immunological biomarkers during SCA steady state. So, we performed the frequency of innate and adaptive immunity cells, cytokines, chemokines and growth factors measurement, Toll-like receptors and adhesion molecules expression in the blood of SCA patients and healthy donors to evaluate the different profile of these biomarkers, the relationship among them and its correlation to laboratory records and death risk.

2. Subjects, Material and Methods

2.1 Ethics Statement

All protocols and consent forms were approved by the Ethical Committees on Research from the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) through the protocol CAEE (no.56413316.9.0000.0009). The subjects involved in the study signed an informed written consent form in accordance to Resolution 196/96 at the National Health Board for research involving human subjects prior to participate.

2.2. Study Population

This study included 100 subjects categorized in two subgroups referred as: Sickle Cell Anemia Patients (SCA) with 30 subjects at steady state, patients were not in crises and had not received blood transfusions in the preceding 3 months, and Healthy Donor (HD) with 70 subjects without any apparent disease. A non-probabilistic convenience sampling was performed to select patients and healthy donors that go to the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM, Manaus, Amazonas, Brazil) to treatment and blood donation, respectively with negative results for serologic screening tests, including viral hepatitis (A, B and C), HIV, syphilis, Chagas disease and HTLV-1/2. The SCA patients' group was composed by both genders' subjects (20 females and 10 males), age ranging from 18 to 49 years (30 ± 8.9) and homozygous to HbS (HbSS). The HD group was composed by both genders' subjects (52 males and 18 females) age ranging from 20 to 61years (32 ± 10.6). Pregnant women, indigenous, subjects with other hematological diseases (leukemia and other anemias), subjects are doing or have been treated for cancer and with inflammatory and infectious diseases such as malaria, dengue, Chagas Disease, mycoses, Zika, Chikungunya, pneumonia, pharyngitis, tonsillitis and bronchitis, were not included

The choice of SCA subgroups was based on the clinical importance of hemolysis (reticulocytes), hemostasis and inflammation (platelets) and clinical complications inherent to the physiopathology of sickle cell anemia. The association of reticulocytosis and thrombocytosis (platelet count above $400 \times 10^6/\text{mm}^3$) in the clinical severity of this disease was shown in previous studies[28]. The categorizations of these subgroups were done by GraphPad Prisma version 5.0 software (San Diego, CA, USA) using descriptive analysis establishing minimum 25% percentile, median and maximum 75% percentile. Considering that all patients present reticulocytosis and thrombocytosis, we classify them as low (below the median) and high (above the median). The median of reticulocytes was $400 \times 10^6/\text{mm}^3$ and of platelets was $450 \times 10^6/\text{mm}^3$. The death risk as calculated by “Sickle Cell Disease Severity Calculator”, available from <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects> describe previously for calculation of severity scores and classification of patients into categories by phenotype (mild, intermediate, severe) [13]. However, we did not use the rating used by Junior et al. (2015) because the patient population would be classified as 4/30 as intermediate and 26/30 as severe, which would make it impossible to segregate patients by robust statistical analysis. Therefore, the criterion of the median severity score (0.670, 67%) was chosen to classify the patients as more and less severe, with 15/30 with low severity (<0.670) and 15/30 with high severity (>0.670).

The clinical and demographical data were acquired by a standardized questionnaire and the hematological profile was assessed by automated blood count carried out at Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. The demographic data and hematological and clinical characteristics of patients and healthy donors are summarized in table 1.

2.3 Immunophenotypic analysis of innate and adaptative components.

The immunophenotypic characterization was performed by Flow Cytometry technique. The cells were obtained from an aliquot of 100µL from peripheral blood collected with EDTA and were incubated in the presence fluorescent labeled specific anti-human cell surface monoclonal antibodies: Anti-CD3FITC/CD8PE/CD4PercP/ CD69APC to identify CD4+ and CD8+ T cells; Anti-CD4FITC/CD25PercP/FoxP3 AF647 to identify regulatory T cells; Anti-CD5FITC/CD19PE to identify B and B1 cells; Anti-CD16FITC/CD56PE/CD3PercP/CD69APC to identify NK and NKT cells; Anti-CD123FITC/CD11cPE to identify Classical and Plasmacytoid dendritic cells; Anti-CD14FITC/CD80PE/CD16PercP/HLA-DRAPC to identify Monocytes Subtypes; Anti-CD14FITC/CD16PercP/CD282PE TLR2 to identify TLR2 expression in Monocytes and Neutrophils; Anti-CD14FITC/CD16PercP/CD284PE to identify TLR4 expression of in Monocytes and Neutrophils; Anti- CD14FITC/CD16PercP/CD289PE to identify TLR9 expression in Monocytes and Neutrophils; Anti-CD4FITC/CD11bPE/ CD3PercP to identify Mac-1 expression in CD4+ T cells; Anti-CD8FITC/CD11bPE/ CD3PercP to identify Mac-1 expression in CD8+ T cells; Anti-CD4FITC/CD49dPE/ CD3PercP to identify VLA-4 expression in CD4+ T cells and Anti-CD8FITC/ CD49dPE/CD3PercP to identify VLA-4 expression in CD8+ T cells, purchased from BD Bioscience (San Diego, CA, USA), Beckman Coulter (Brea, California, USA) and Biolegend (San Diego, CA, USA). Following the incubation, cells were treated with 2 mL of erythrocyte lysing solution for 7,5 min at room temperature. After two centrifugation steps and one wash step with PBS, non-intracellularly labeled cells were resuspended in 300 µl PBS and intracellularly labeled cells were incubated with PBS-saponin, followed by a centrifugation step and resuspension in PBS. Stained cells were stored at 4°C up to 24 h prior flow cytometric acquisition. A total of 30.000/100.000 events were acquired for each blood sample to quantify cell types.

The sample acquisition was performed on the FACSCalibur[®] Flow Cytometer (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) of the Fundação HEMOAM. For the morphometric and immunophenotypic identification of the cells, the FlowJo software (version 7.2) was used, with the design of gates to select the target populations in graphs that combine morphological characteristics (size and granularity) with immunophenotypic characteristics through fluorescence of the monoclonal antibodies used to identify the target cells.

2.4 Cytokines, Chemokines and Growth Factors Analysis

The serum cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-7, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 e IL-10, chemokines IL-8, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 and RANTES and growth factors VEGF, FGF-basic, PDGF, GM-CSF and G-CSF were measured using Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex kit (Bio-Rad, California, USA) following manufacturer's instructions by Luminex assay. Data acquisition and analysis was performed using Luminex 200 System equipment and Bioplex Manager software, respectively. The results were expressed as pg/mL, as assessed by the standard curve using the fifth-logistic regression parameter. The limits of detection were IL-1 β = 8.608 pg/mL, IL-6 = 37.680 pg/mL, TNF- α = 64.803 pg/mL, IL-12 = 37.684 pg/mL, IFN- γ = 25.411 pg/mL, IL-2 = 18.297 pg/mL, IL-7 = 16.593 pg/mL, IL-4 = 4.789 pg/mL, IL-5 = 23.105 pg/mL, IL-13 = 8.090 pg/mL, IL-17 = 28.850 pg/mL, IL-10 = 35.170 pg/mL, IL-8 = 42.150 pg/mL, IP-10 = 31.236 pg/mL, MIP-1 α = 960 pg/mL, MIP-1 β = 11.233 pg/mL, MCP-1 = 24.282 pg/mL, RANTES = 16.533 pg/mL, VEGF = 29.464pg/mL, FGF-basic = 16.046 pg/mL, PDGF = 24.721 pg/mL, GM-CSF = 12.844 pg/mL, G-CSF = 40.049 pg/mL.

2.5 Data Analysis and Conventional Statistics

All data were considered as presenting a non-parametric distribution, and therefore, the comparative analyzes about the frequency of cells and levels of cytokines, chemokines and growth factors were compared between HD and SCA groups by *Mann Whitney* test two-tailed.

Analyses between the low and high subgroups were performed using the ANOVA variance analysis followed by the *Kruskal-Wallis* test followed by *Dunn`s* multiple comparison test. A 95% confidence interval was used and the data considered with statistical significance were those with p value <0.05 . The GraphPad Prism software version 5.0 (San Diego, CA, USA) was used for data analysis.

2.6 Biomarker Signature Analysis

The cellular and serum biomarkers ascendants signatures were assembled as previously reported by Luiza-Silva and coworkers [29]. This model of analysis allows to convert continuous measurements into a categorical analysis. Initially, the whole universe of data of each biomarker were used to calculate the global median value used as the cut-off to classify each subject as the present values below or above the cut-off edge. Thereafter the ascendant signatures of cell phenotype features and serum immunological biomarkers were assembled considering the frequency of subjects with values above the global median cut-off determined for each biomarker. Overlay of ascendant biomarker signature curves were employed to identify those biomarkers with frequency of subjects above the 50th percentile, further highlighted for subsequent Venn diagram analysis to identify those biomarkers commonly or selectively observed amongst groups. The GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, USA) as used for graph arts.

2.7 Biomarkers Networks Assembling

Biomarker networks were assembled to evaluate the multiple associations among the cells and cytokines/chemokines/growth factors in the SCA patients and subgroups. The association between the quantitative levels of cells, cytokines, chemokines and growth factors was performed by the Spearman correlation coefficient in GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, USA) and statistical significance were considered only if $p < 0.05$. After performing the correlation analysis between biomarkers, a database was created on the Microsoft Excel

program 2010. Then, the significant correlations were compiled using the open access software Cytoscape (version 3.6.1) as previously reported. The biomarker networks were constructed using circular nodes for each cells, cytokines, chemokines and growth factors, including white circles to HD, black circles to SCA, light grey to low subgroups and dark grey to high subgroups assembled in circular layouts. The correlations indices (r) were used to categorize the correlation strength as negative ($r < 0$), moderate ($0.36 \geq r \leq 0.68$) and strong ($r > 0.68$) represented by connecting edges as proposed by Taylor et al [30].

3. Results

3.1 Major phenotypic features of innate and adaptive immunity in patients with sickle cell anemia.

The innate immunity cell phenotypes in SCA patients are presented in Figure 1. Low frequency of neutrophils, classical and plasmacytoid DCs, along with decrease percentage of NK and NKT cells were observed in SCA as compared to HD (Figure 1a). Conversely, increased frequency of activated inflammatory monocytes (CD14+CD16+ HLA-DR+), B1 lymphocytes as well as enhanced expression of TLR-9 by neutrophils and monocytes were also observed in SCA patients (Figure 1a and 1b). Phenotypic features of adaptative immunity cells are presented in Figure 2. Data analyses demonstrated high frequency of lymphocytes, activated TCD4+, TCD8+, TCD4+/TCD8+ ratio, B lymphocytes and high expression of Mac-1 in TCD4+ cells in SCA patients compared to HD (Figure 2a and 2b). Furthermore, decreased levels of CD4+ and CD8+ lymphocytes, beside decreased expression of Mac-1 in TCD8+ cells were also observed in SCA group (Figure 2a and 2b).

3.2 Phenotypic features of innate and adaptive immunity in patients with sickle cell anemia according to laboratorial and clinical records.

Aiming at further characterizing the profile of innate and adaptive immunity cells in SCA, the patients were categorized according to their laboratorial and clinical records, including reticulocyte counts, platelet levels and death risk scores. The results are presented in Figure 3. The reference values observed in HD are presented as interquartile range (25th-75th) for each cell phenotypes evaluated (Figure 3, gray background). Data analysis demonstrated that high frequency of activated inflammatory monocytes (CD14+CD16+HLA-DR+) and increased expression of TLR9 by neutrophil and monocytes are observed in SCA patients regardless the laboratorial and clinical conditions. Moreover, lower levels of classical and plasmacytoid DCs, besides NK and NKT cells were also found in SCA patients regardless the presence of

reticulocytosis, thrombocytosis and high death risk (Figure 3a and 3b). The SCA patients with high platelet count showed elevated frequency of activated neutrophils and increased expression of TLR2 by monocytes compared to HD (Figure 3a and 3b). Furthermore, enhanced expression of TLR2 by monocytes was observed in SCA patients with high death risk score (Figure 3b).

The analysis of adaptive immunity cells revealed that despite the low levels CD4⁺ T-cells and CD8⁺ T-cells, SCA patients exhibited high frequency of CD4⁺CD69⁺ T-cells, CD8⁺CD69⁺ T-cells and CD19⁺ B-cells regardless the laboratorial/clinical score (Figure 3c). In addition, the results demonstrated that Mac-1 expression by CD8⁺ T-cells was significantly lower in SCA patients with low reticulocyte counts (Figure 3d). Moreover, increased VLA-4 expression by CD8⁺ T-cells was found in SCA with high death risk score (Figure 3d). Remarkably, SCA patients with high death risk presented increased expression of TLR2 by monocyte and VLA-4 by CD8⁺ T-cells in comparison with those SCA patients presenting low death risk (Figure 3b and 3d). Conversely, SCA patients with low reticulocyte counts showed decreased expression Mac-1 by CD8⁺ T-cells as compared to patients with high reticulocyte counts (Figure 3d).

3.3 Serum immunological biomarkers in sickle cell anemia patients.

The profile of serum cytokines, chemokines and growth factors observed in SCA patients are shown in Figure 4. Data demonstrated that SCA patients displayed an overall increase of most immunological biomarkers evaluated, include IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-10, IL-8, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, VEGF, FGF-basic and GM-CSF as compared HD (Figure 4a, 4b and 4c). Decreased levels of IL-2 and IL-13 were also observed in SCA patients (Figure 4a). Unaltered levels of TNF- α , IL-7, IL-5, MCP-1 and G-CSF were found in serum samples from SCA as compared to HD (Figure 4a, 4b and 4c).

3.4 Serum immunological biomarkers in patients with sickle cell anemia according to laboratorial and clinical records.

The serum levels of cytokines, chemokines and growth factors were further evaluated in SCA patients categorized according to their laboratorial and clinical records and data shown in Figure 5. The reference values observed in HD are presented as interquartile range (25th-75th) for each immunological biomarker analyzed (Figure 5, gray background). Increased levels of IL-1 β , IFN- γ , IL-12, IL-17, IL-10, IL-8, IP-10, MIP-1 α and VEGF, but low levels MIP-1 β were observed in SCA patients regardless the laboratorial and clinical scores as compared to HD reference ranges. The high concentrations of IL-6, RANTES and G-CSF were showed in SCA patients regardless the reticulocyte counts. TNF- α , IL-2 and GM-CSF were increased in SCA patients with low reticulocyte counts. IL-4, IL-13, FGF-basic were detected in SCA patients with high reticulocyte counts as compared to HD reference ranges. High levels of IL-6 was demonstrated in SCA patients with low platelet counts. Enhanced levels of IL-2, IL-7, IL-4 and GM-CSF were observed in SCA patients with high platelet counts as compared to HD reference ranges. Increased levels of IL-6, IL-4, IL-13, MCP-1 and GM-CSF were found in SCA patients with high death risk as compared to HD reference ranges. Remarkably, SCA patients with high death risk presented increased levels of IL-10, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES in comparison with those SCA patients presenting low death risk. Likewise, SCA patients with high platelet counts presented increased levels of IL-17 and MIP-1 α as compared to those with low platelet counts (Figure 5a, 5b and 5c).

3.5 Signatures of cell phenotypes features and serum immunological biomarkers in patients with sickle cell anemia according to laboratorial and clinical records.

The signatures of cell phenotype features and serum immunological biomarkers were assembled as the frequency of subjects with values of cells from innate and adaptative immunity or serum biomarkers above the global median cut-off, aiming at identifying the attributes that

characterize the immunological profile of SCA patients and their respective laboratorial and clinical records. According to this categorical descriptive analysis, it was possible to select the most relevant biomarkers observed in more than 50% of subjects on each group (Figure 6 – gray background). Data analysis demonstrated that in general the SCA patients presented higher number biomarkers above the 50th percentile as compared to HD (Figure 6a). Slight differences were observed in the number of cellular biomarkers above the 50th percentile while comparing the SCA subgroups (Figure 6b).

Venn diagram analyses further demonstrated that a set of cell phenotypes features were commonly observed in more than 50% of SCA patients, regardless their laboratorial and clinical records, including CD14+CD16+MON, CD4+CD69+ and CD8+CD69+ (Figure 6b – black squares). Furthermore, specific biomarkers were selective identified in the ascendant signatures of SCA patients with low reticulocyte counts, high platelet counts and high death risk, included CD8+CD11b+, CD11b+NEU, CD8+CD49d+ and TLR2MON, respectively (Figure 6b).

A clear cytokine storm was observed in SCA patients as compared to HD. Data analysis demonstrated that SCA patients presented a massive increase in most serum immunological biomarkers as observed by the frequency of subjects with levels above the 50th percentile as compared to HD (Figure 6c). Comparative analysis between SCA subgroups demonstrated that SCA patients with high death risk display higher number of altered biomarkers as compared to those with low death risk (Figure 6d). Venn diagram analyses demonstrated that a set of serum biomarkers were commonly observed in more than 50% of SCA patients, regardless their laboratorial and clinical records, including IL-8, IP-10, IL-12 and IL-10 (Figure 6d – black squares). However, no selective biomarkers could be identified for a given SCA subgroup (Figure 6d).

3.6 Cell phenotypes and serum biomarker networks in patients with sickle cell anemia according to laboratorial and clinical records.

Aiming at characterizing the integrative and multiparametric analysis of the immune response in SCA patients, a correlation analysis between cell phenotypes as well as amongst serum biomarkers were carried out and the network profiles assembled according to the negative or positive correlations between pairs of attributes (Figure 7, 8 and 9). Data demonstrated that SCA patients presented complex and imbricated cell phenotype network rich in negative connections compared to HD (Figure 7a). In fact, while HD displayed a strong correlation between innate immunity receptors and Treg cells the SCA patients displayed positive connections between CD4+CD69+T and CD8+CD69+, TLR4NEU, TLR4MON, TLR9MON along others involving TLR4NEU, TLR2NEU, TLR4MON and TLR2MON.

Analysis of serum biomarker networks revealed that a small number of positive edges were observed for in SCA as compared to HD (Figure 7b). It was noticed that while in HD, IL-10 have several connections modulating the immune response and make an interesting triad between IL-10/IL-12/VEGF, in SCA patients IL-10 display a relevant loss of connections remaining only a strong positive connection with IP-10, not observed in HD. In SCA, interesting triads are observed IFN- γ /IL-12/VEGF, IL-12/IL-17/MIP-1 β and IL-1 β /IFN- γ /TNF- α , suggesting an intense inflammatory response.

The cellular networks assembled for SCA subgroups according to laboratory and clinical records are presented in Figure 8. The results demonstrated that SCA patients with high reticulocyte counts (RET High subgroup) presented a stronger network compared to those with low reticulocyte counts (RET Low subgroup). On the other hand, SCA patients with high platelet counts or high death risk presented a significant loss of connection. Interestingly, patients with high reticulocyte counts and high death risk presented strong connections such as TLR9NEU/B-cell/TLR9MON and CD4+CD69+T/TLR4MON. SCA patients with high death

risk. The SCA subgroup with low platelet counts has a peculiar network with a relevant increase of negative connections (Figure 8).

The serum biomarker network assembled for SCA subgroups according to laboratory and clinical records are presented in Figure 9. Data analysis demonstrated that in general, SCA patients presented positive connections between the pairs IL-17/MIP-1 β , IL-12/ VEGF and IL-10/IP10, regardless their laboratorial records. It is noticed that although IL-10 make few connections, the IL-10/IP-10 link is observed in all SCA subgroups. SCA subgroups with high reticulocyte counts presented stronger connections as compared to those with low reticulocyte counts. However, SCA subgroups presented strong biomarker connections regardless their platelet counts or death risk scores (Figure 9). SCA patients with high reticulocyte counts and high death risk presented a more similar network highlighted by common connections TNF- α /IL-1 β /MIP-1 α triad, IFN- γ /IL-13, IL-17/ IL-4 and IL-4/IL-2 axes. The SCA patients with high platelet counts displayed a more peculiar network mediated by several positive connections (Figure 9).

4. Discussion

The sickle cell anemia is a complex clinical syndrome caused by the presence of HbS and erythrocyte injury that leads to extra- and intravascular hemolysis, inflammation, endothelial dysfunction and vasculopathy, accompanied by heterocellular leukocyte-platelet-erythrocyte-endothelial adhesive events that trigger vaso-occlusive episodes of small and large blood vessels producing acute organ ischemia, and reperfusion injury [22]. Many studies have confirmed the association of indirect markers of hemolysis with certain complications of disease. Belini Junior et al [13] in their study about severity of Brazilian sickle cell disease patients showed in all patients the relationship of reticulocytes, hemoglobin, leucocytes, LDH, bilirubin and HbS biomarkers with severity score were statistically significant, that is SDC severity is associated with these markers. Our SCA patients at steady state presented an intense

reticulocytosis and when evaluate the immunologic biomarkers in this condition, the relation between these markers are very similar in the high death risk condition.

The immune abnormalities in SCA can contribute to vaso-occlusive crises, increase susceptibility to infection and may potentially explain incidences of impaired magnitude or duration of responses to vaccines. These conditions leads to significant morbidity and/or risk of death in individuals with SCA [9,13,27,31]. In this study were analyzed cells, receptors, adhesion molecules, cytokines, chemokines and growth factors of innate and adaptative immunities from SCA patients aiming to better understand the involvement of the immune response in the pathophysiology and morbidity of SCA and thus identify immunological biomarkers that may be related to laboratory conditions and clinical severity of SCA.

Our results explicitly show that patients with SCA at steady state have high frequency of adaptive immune cells rather than innate immune cells. Although TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocytes were significantly decreased in SCA patients compared to the HD group, the frequency of these activated cells was significantly higher in patients compared to HD group regardless the low and high laboratory and clinical conditions evaluated. The value of T-cell subsets in patients with homozygous SCA is variable [32]. Koffi and coworkers (2003) showed CD8⁺ T cells significantly increased and no difference between CD4⁺ T cells in SCA patients compared to their control group [32]. However, Kaaba and Al-Harbi (1993) and Vingert and coworkers (2015) also showed lower frequency of TCD4⁺ and CD8⁺T cells in SCA patients compared to HD individuals [25,33]. The reduction in the proportion of circulating CD4⁺ and CD8⁺ cells was show to be more profound in the presence of splenic defects and SCA is invariably accompanied by hyposplenism [27,32].

The TCD4⁺/TCD8⁺ ratio was higher in SCA patients than HD group, indicating that there is an increased absolute number of TCD4 cells and fewer TCD8 cells in SCA patients (this means a normal ratio). However, a reversal of the normal ratio, that is a relative increase in the number of TCD8⁺ lymphocytes in SCA patients has been shown by Adedeji (1985) [34].

Even though, these cells were more activated in SCA patients indicating that they are acting on the immune response [25]. Rêgo et al [35] and Vingert et al [24] reported in their works an increase in the regulatory T cells (CD4+CD25+FoxP3+) frequency in SCD patients compared to the HD group. However, this increase can be related to previous blood transfusion or to the body's attempt to minimize inflammation intrinsic to SCA [24,35,36]. Our results show that Tregs appears to be increased in SCA compared to the HD, but this difference was not significant.

Mac-1 molecule is a very important to mediate the interaction between RBC and adherent leucocytes and promotes vaso-occlusion in SDC. It was observed by Chen et al that Mac-1 deficiency significantly prolonged the survival of SCD mice during and after the experimental procedure [37]. Our results showed that TCD4+CD11b+ may have an effective participation in the process of endothelium adhesion and occlusive vessel crisis and regardless of reticulocytosis, thrombocytosis and death risk in contrast to TCD8+ lymphocyte that had low expression of Mac-1 compared to the HD group.

The VLA-4 molecule (CD49d) is the only integrin maintained on the surface of young SS erythrocytes and reticulocytes, which are increased in the peripheral blood of SDC patients and mediate adhesion of these cells to endothelium [38]. Canalli et al [39] demonstrated that VLA-4 in neutrophils, despite its low expression, participate in the *in vitro* adhesion of sickle cell disease neutrophils to endothelial layers under both basal and tumor necrosis factor- α stimulated conditions. Our results showed no difference in VLA-4 expression either the TCD4+ or TCD8+ lymphocytes in SCA patients compared to the HD group, but it appears to be increased in CD4+ T lymphocytes. Although, when we evaluated this marker in laboratory and clinical conditions of SCA, appears that high VLA-4 expression in TCD8+ to be a selective biomarker for high death condition, also showed by signature analyses. The higher expression of VLA-4 in TCD8 + lymphocytes increases its adhesion to vascular endothelium, affecting the

microenvironment through cytokines and interactions with other cell types and extracellular matrix [40].

Several studies have shown that the proportions of circulating B cells in SCA are generally unaltered [27,41,42]. Venkataraman and Westerman [43] showed no significant changes in the percentage of B cells in SCA patients at steady state compared to control group individuals, however show that changes in *in vitro* B cell function occur during vaso-occlusive pain crises in SCA patients. Unlike the cited data, we observed in our work a significant increase in the frequency of B (CD5-CD19+) in SCA patients at steady state regardless reticulocytosis, thrombocytosis and death risk conditions compared to HD. Kaaba and Al-Harbi [33] and Bao et al [44] have been observed too increases in B cells in SCA patients at steady state and they claim that higher numbers of B lymphocytes are observed in adults with SCA with increased circulatory Th2 cytokines, IL-4 and IL-10. The multiple blood transfusions in SCA patients can induces B-cell differentiation and immunoglobulin secretion and consequently alloimmunization [27].

About innate immunity cells our results showed a lower frequency of total neutrophils count and no difference in frequency of total monocytes count compared to healthy donors unlike several studies [45–49]. However, in the SCA patients evaluated in our work the neutrophils appear to be more activated (CD11b+) than HD. Increasing evidence indicates that (activated) neutrophils could play an important role in the initiation and propagation of vaso-occlusive processes in SCD [50]. Lard et al [50] and Kerst et al [51] observed similar result with decrease in neutrophil count that has been the most likely caused by activated neutrophils due to high expression of the CD11b molecule and consequently greater adhesion to the vascular endothelium. So, neutrophils may have left the circulation and are therefore under-represented in the blood. We observed by our analyses high frequency of activated neutrophils expressing CD11b+ in high thrombocytosis and making rare connections with other markers.

So, appears that neutrophils CD11b+ in our SCA patients at steady state are aggregated with platelets. Platelets can also bind to erythrocytes, monocytes, and neutrophils to form aggregates.

Between monocytes subsets only activated inflammatory monocytes (CD14+CD16+HLA-DR+) were significantly elevated in SCA patients. Singhal et al [52] showed similar results to our, which observed very low count of total monocytes and high percentage for inflammatory monocytes (CD14+CD16+HLA-DR+). In SDC patients, monocytes presented a significant expression of phosphatidylserine on surface indicating the probability of early activation of apoptosis, which could be a possible reason for low counts of these cells in patients [52]. Singhal et al also described in their study that CD14+ monocytes when engulf the Hb-activated platelets, a frequent and characteristic condition of SCA [53], were transformed into highly inflamed CD14+CD16+ subtype. This condition may be happening in our SCA patients at steady state.

We observed high frequency of B1 cells (CD5+CD19+) in SCA patients compared to HD. Human B1 cells (CD5+CD19+), spontaneously secrete IgM, expressed an Ig repertoire targeted to a narrow range of antigens such as phosphorylcholine and DNA [54]. These cells also promote homeostasis and can modulate the immune response by secreting the anti-inflammatory cytokine IL-10.. Natural IgM produced by B1 cells has been shown to promoting inflammation by activating the classical complement cascade, and causing tissue destruction by binding to epithelial antigens exposed upon ischemia-reperfusion injury[55]. Possibly by this mechanism, B1 lymphocytes are contributing to the pathophysiology of SCA. Furthermore, it was shown by Paglieroni et al [56] in SCA patients had received blood transfusion, but none have received a transfusion within 3 month, significant differences in CD5+ B-cell (B1 cell) percentages and absolute numbers compared to healthy never-transfused blood donors.

Among toll-like receptors, only TLR9 in both neutrophils and monocytes were highly expressed. Pitanga et al [57] showed higher expression of *TLR2* and *TLR4* genes and no differences in *TLR9* expression in PBMC of 12 SCA patients at steady state. Although, they did

not analyze TLR proteins, they believe the continuous exposure to SS-RBC can affect TLR pathways. Some authors have described under certain conditions, such as elevated IL-4 and IL-10 or inappropriate concentration of a given stimulus (TLR2 and TLR4 agonists) is not sufficient to induce TLR2 and TLR4 upregulation on the surface of monocytes and neutrophils possibly because the baseline expression of these receptors might be sufficient and an upregulation would only occur after higher stimulus [58–60]. Although, we observed by other analyzes high expression of TLR2 in monocytes in high thrombocytosis and appears to be a selective biomarker to high death risk. The network show TLR2 and TLR4 from neutrophils and monocytes making connections among them and with CD4+CD69+ T cells.

The circulating cell-free DNA in SCA patients even at steady state can be recognized by TLR9 [61,62]. Perhaps in our SCA patients at steady state, the hemolysis process and the release of heme are contained, not releasing sufficiently high concentrations to induce upregulation of TLRs 2 and 4, however sufficient to induce TLR9 expression. Besides that, we could observe by biomarker network analyze, TLR9 in neutrophils and monocyte making positive connection with B-cell both in high reticulocytosis and high death risk. This correlation can be for TLR9 stimulation induces maturation of antigen presenting cells favoring a Th1 immune response and stimulates antigen-independent B-cell proliferation [63,64].

We are the first to show classical or myeloid and plasmacytoid DCs subsets profile in SCA patients at steady state. Both subsets the frequency was low in the SCA patients compared to HD. Urban et al [65] evaluated cDC and pDC frequencies in children with α -thalassemia and the sickle cell trait. They showed significant reduction of mDC frequency in children homozygous for α -thalassemia whether or not if they were also carriers for HbS (AA $-\alpha/-\alpha$ and AS $-\alpha/\alpha\alpha$, AS $-\alpha/-\alpha$) compared to normal healthy children (AA $\alpha\alpha/\alpha\alpha$) [65]. They suggest the most likely possibilities are reduced mDC production in the bone marrow or chronic activation and enhanced retention of mDCs in the spleen.

Sickle cell disease (SCD) is associated with alterations in immune phenotypes [66] and we decided to evaluate NK and NKT frequencies on SCA patients at steady state. Recently, ischemia reperfusion injury (IRI) with resultant white cell activation has been implicated as an additional contributor to the pathophysiology of SCD [67]. Our results showed low frequencies of NK and NKT cells in SCA patients at steady state. In ElAlfy et al [66] study they showed NK cell frequency higher in all patients with SCD compared with controls, but the difference was not significant. Furthermore, they showed elevated counts of NK cells with higher levels of IFN- γ , so these cells were activated in SCA patients. They suppose the increased number of NK cells among their patients was associated with history of frequent vaso-occlusive crisis, but they could not compare patients with vaso-occlusive crisis and those with stable SCD. Kaplan et al [68] showed lower NK activity in SCA patients that receive repeated blood transfusion compared to normal controls.

The activation of RBCs, leucocytes, platelets and endothelial cells, leads to increased production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, which gives SCA characteristics of a chronic inflammatory disease [69]. Our results showed increased levels of Th1 and Th17 cytokines profiles (IFN- γ , IL-12, IL-17) and inflammatory and regulatory cytokines pattern (IL-1 β , IL-6, IL-4 and IL-10) in SCA patients at steady state. The chemokines IL-8, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES and the growth factors VEGF, FGF-basic and GM-CSF were higher in SCA patients.

There are a few reports in the literature pertaining to the role of IL-12 and IL-17 in SCA [10,69]. Unlike our results, Taylor et al [70] did not observe detectable levels of IL-12 in SCA patients at steady state compared to healthy control subjects, however as in our study, they observed high levels of IFN- γ . In SCA patients from Oman city the mean serum level of IFN- γ was higher in both steady state (95.71 pg/mL) and crisis patients (90.13 pg/mL) compared to control subjects (74.42 pg/mL) [71]. Thus, IL-12 can also negatively affect the development,

homeostasis and function of nTreg cells by limiting IL-2 expression [71]. The immunoregulatory functions of IFN- γ are diverse and include the activation of mononuclear phagocytes and neutrophils, the upregulation of class I molecules of the major histocompatibility complex (MHC-1). The IL-2 signaling promotes the development of both Th1 and Th2 cell types by inducing expression of IL-12R β 2 and IL-4R α respectively [72] and has been reported to suppress Th17 development inhibiting IL-17 production [72].

The role of IL-17 in SCA is not well understood [69]. Corroborating with our results Vilas-Boas et al [10] and Keikhaei et al [69] observed higher levels of IL-17 in SCA patients at steady state than healthy donors. Vilas-Boas et al still found a positive association among homocysteine and IL-17 and suggest a possible role of homocysteine in the induction of IL-17. We also observed high levels of IL-17 in high thrombocytosis. Bouchnita et al [73] demonstrated that IL-17 enhanced the level of platelet aggregation from 20% to 45-50% and lead to thrombosis and vessel occlusion.

Increased levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α have been reported in serum from patients with SCD [69,71,74–77]. Selvaraj et al [76] shown that monocytes isolated from SCD patients are in highly activated state as demonstrated by increased gene expression of IL-1 β as well as TNF- α compared with monocytes from healthy individuals. Our results shown detectable levels of TNF- α in SCA patients at steady state, but no significant differences. Pathare et al [71] showed very similar levels of TNF- α between SCA patients at steady-state and control group, but in patients in crisis, the level was higher compared to the control group, despite the non-significant difference.

Chemokines contribute to SCD pathogenesis by acting on leucocytes [78]. The IL-8 is involved in both endothelial cell proliferation and angiogenesis produced by several types of cells such neutrophils, macrophages, endothelial cells and induces leucocytes chemotaxis and neutrophil degranulation [69,78]. Elevated levels of IL-8 are observed in SCD patients during

crises and have been proposed to be a vaso-occlusion crises predictor [79]. Pathare et al [71] observed, like our results, significant high levels of IL-8 in SCA patients at steady state compared to healthy donors and despite having observed a higher level in patients in crisis, was not a significant difference between steady state and crises. Hazin-Costa et al [80] also observed high levels of IL-8 in SDC patients at steady state compared to healthy donors.

The MIP-1 α and MIP-1 β are chemokines with inflammatory properties, highly related and that share 68% identical amino acids [81]. Selvaraj et al [76] showed high expression of MIP-1 β in monocytes activated from SDC patients compared to monocytes from healthy individuals. Wu et al [82] demonstrated in autoimmune hemolytic anemia that elevated circulating level of MIP-1 β indicate a boost in erythroid proliferation and reticulocytosis. It is possible that in SCA this chemokine can be acting that way. Preclinical studies have further demonstrated that MIP-1 α is released upon the induction of Th1 responses and by neutrophils and monocytes during monocyte-endothelial cell interactions that serves as an important mechanism in sustaining the recruitment of cells during inflammatory responses [81]. In SCA, MIP-1 α is possibly also mediating this mechanism. Also, we observed high level of MIP-1 α in high thrombocytosis. Klinger et al [83] showed that MIP-1 α are present within the α -granules of human platelets.

Enhanced expression of MCP-1 was demonstrated in a variety of pathologic conditions, associated with inflammation and mononuclear cell infiltration [84]. Higher level of MCP-1 is also associated with the development of polarized Th2 responses [85]. Although, our results as well as those of Hazin-Costa et al [80] did not show statistical difference in the MCP-1 level between SCA patients at steady state and healthy donors. Although SCA is a chronic inflammatory disease, MCP-1 may be inhibited by the presence of the heme oxygenase 1 (HO-1) enzyme, which is increased in SCA patients [86,87]. Sickle erythrocytes release large

amounts of hemoglobin after hemolysis, endothelial HO-1 induction may serve to control excessive heme overload [87].

Unlike our results significant levels of RANTES and IP-10 between SCA patients at steady state and healthy donors did not show by Hazin-Costa et al [80]. However, Driss et al [88] show elevated serum levels of IP-10 in patients with homozygous sickle cell disease. In the SCA pathophysiology, RANTES still induces activation of Gardos channel (Ca-dependant K^+ channel) in sickle erythrocytes by increase affinity constant for intracellular Ca^{+} result in intracellular depletion of K^+ and dehydration of sickle red blood cells [89]. Apparently, in SCA, RANTES can be important to perivascular recruitment of $INF-\gamma$ -producing T cells which may affect vascular dysfunction [90].

There are conflicting reports on the role of IL-4 and IL-10 anti-inflammatory cytokines in SCA patients [69]. Pathare et al [71] and Raghupathy et al [91] demonstrated significantly higher levels of IL-4 in SCA patients at steady state like our results. Taylor et al [92] also demonstrated higher levels of IL-4 and IL-10 in SCA patients at steady state, even though, Cavalcante et al [93] shown not significant different serum levels of IL-10 between steady state SCA patients and control subjects. Musa et al [14] demonstrated higher levels of IL-4 in SCA patients in vaso-occlusive crises than steady state and controls subjects, however corroborating with our results the levels of IL-10 as higher in SCA patients at steady state than in crises and control individuals. The exacerbated inflammatory process within the vascular environment of the SCA patients could be responsible for triggering the compensatory Th2 responses emphasizing the role of an injured endothelium and activated monocytes [94]. The others Th2 cytokines, IL-5 and IL-13 were not elevated in SCA patients at steady state compared to healthy donors unlike what has been demonstrated by Veiga et al [94]. Possibly, in our SCA patients, the high levels of IL-17 can be affecting IL-5 and IL-13 production.

T-cell homeostasis requires a balance in programs underlying activation and apoptosis with those controlling quiescence and survival. In healthy, T-cell replete animals naive CD4 T-

cells are sustained by self-peptide and IL-7 signals [95]. We did not demonstrate significant difference in IL-7 levels between SCA patients and healthy donors. Although, in SCA, due the high levels of activated TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocytes, the IL-7 level maybe being controlled by negative feedback.

Angiogenesis is a highly regulated process and requires coordinated signalling events among a variety of angiogenic factors [96]. Gürkan et al [97], Solovey et al [98] and Cao et al [99] demonstrated higher levels of VEGF and FGF-basic in HbSS patients at steady state corroborating with our results, and even higher levels in SCA patients with painful vaso-occlusive crises. Nevertheless, even platelet activation has also been proposed as significant contributing factor to the pathogenesis of and outcome of SCD patients [100]. However, showed that SCA patients during vaso-occlusive crises had higher levels of PDGF compared to healthy controls and steady state.

Regarding the colony-stimulating factor, only GM-CSF was higher in SCA patients at steady state compared to healthy donors, while G-CSF was not significantly different. Conran et al [101] demonstrated that circulating levels of GM-CSF in steady-state patients with SCD were significantly higher than in healthy controls and G-CSF levels was significantly lower. Besides that, demonstrated GM-CSF levels correlated significantly with the numbers of total leukocytes in SCA patients, but G-CSF had a significant negative correlation. GM-CSF can be responsible, at least in part, for the leukocytosis observed with SCD and proinflammatory cytokines like IL-1 β , which are increased in SCD, can be associated with elevated levels of GM-CSF [101].

As discussed above, and by the signature and biomarker network analyzes SCA pathophysiology at steady state appears to be controlled by Th1 and Th17 cytokines (IL-12, IFN- γ , IL-1 β , IL-17), IL-8, IL-10 and IP-10 as general biomarkers and MIP-1 β and RANTES making difference in SCA patients with high death risk. Besides, IL-12 due its antiangiogenic activity [102] appears to controlling VEGF regardless

of any laboratory and clinical condition, IL-10 controlling endothelial adhesion by IP-10 correlation and MIP-1 β stimulating Th17 response by IL-17 correlation. In high reticulocytes and death risk there appears to be a competition of the Th1 and Th17 inflammatory responses with Th2 due the correlations TNF- α /IL-1 β /MIP-1 α , IFN- γ /IL-13, IL-17/IL-4 and IL-4/IL-2. In high thrombocytosis we observed VEGF making several connections with chemokines and cytokines.

In conclusion, our results demonstrated that SCA pathophysiology at steady state there has a broad immunological biomarker cross-talk highlighted by TCD4⁺ lymphocytes, TLR2 in monocytes, VLA-4 in TCD8⁺ lymphocytes, Th1, Th17 inflammatory and IL-10 regulatory cytokines, MIP-1 α , MIP-1 β and IP-10 chemokines and growth factor VEGF. High levels of MIP-1 β and RANTES appears to be relevant in high death risk condition. High reticulocytosis and high death risk conditions present commons correlations, there seems to be balance by Th2 profile. Even though, more studies approaching the same biomarkers in the same patients in crisis or other biomarkers, intracellular signaling pathways, analysis of gene expression of molecules involved in innate and adaptive immune responses are needed to better understand this complex pathophysiological mechanism of SCA.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors thank to FAPEAM, HEMOAM, UFAM, CAPES, CNPq/Brazil and FIOCRUZ/Minas for the financial support. The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health (PDTIS-FIOCRUZ) for the use of its facilities.

References

1. Driss A, Asare KO, Hibbert JM, Gee BE, Adamkiewicz T V., Stiles JK. Sickle cell disease in the post genomic era: A monogenic disease with a polygenic phenotype.

- Genomics Insights. 2009;2: 23–48. doi:10.1016/j.bbi.2008.05.010
2. Rusanova I, Cossio G, Moreno B, Javier Perea F, De Borace RG, Perea M, et al. β -globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Panamá. *Am J Hum Biol.* 2011;23: 377–380. doi:10.1002/ajhb.21148
 3. Chakravorty S, Williams TN. Sickle cell disease: A neglected chronic disease of increasing global health importance. *Arch Dis Child.* 2015;100: 48–53. doi:10.1136/archdischild-2013-303773
 4. Brasil M da S. Doença Falciforme - O que se deve saber sobre herança genética. 2014.
 5. Lervolino LG, Eduardo P, Baldin A, Picado SM, Calil KB, Viel AA, et al. Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. 2011;33. doi:10.5581/1516-8484.20110015
 6. Braga JAP, Veríssimo MP de A, Saad STO, Cançado RD, Loggetto SR. Guidelines on neonatal screening and painful vaso-occlusive crisis in sickle cell disease: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular Project Guidelines: Associação Médica Brasileira - 2016. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2016;38: 147–157. doi:10.1016/j.bjhh.2016.04.001
 7. Silva-Pinto AC, Angulo IL, Brunetta DM, Neves FIR, Bassi SC, Santis GC De, et al. Clinical and hematological effects of hydroxyurea therapy in sickle cell patients: a single-center experience in Brazil. *Sao Paulo Med J.* 2013;131: 238–43. doi:10.1590/1516-3180.2013.1314467
 8. Silva AK. O Contexto Epidemiológico E Biossocial Da Doença Falciforme No Pará , Amazônia , Brasil. *Rev da ABPN.* 2015;7: 103–127.
 9. Chies JAB, Nardi NB. Sickle cell disease : a chronic inflammatory condition. 2001;57: 46–50. doi:10.1054/mehy.2000.1310
 10. Vilas-Boas W, Veloso Cerqueira BA, Figueiredo CVB, Santiago RP, da Guarda CC, Pitanga TN, et al. Association of homocysteine and inflammatory-related molecules in sickle cell anemia. *Hematology.* 2015;4: 151221032123003. doi:10.1179/1607845415Y.0000000048
 11. Stuart MJ, Nagel RL, Jefferson T. Sickle-cell disease. 2004;
 12. Hoppe CC. Inflammatory mediators of endothelial injury in sickle cell disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* Elsevier Inc; 2014;28: 265–286. doi:10.1016/j.hoc.2013.11.006

13. Belini Junior E, Grünig D, Silva H, Souza L De, Viviani J, Lopes C, et al. Severity of Brazilian sickle cell disease patients: Severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. *Blood Cells, Mol Dis.* 2015;54: 321–327.
14. Musa BOP, 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: 602–608. doi:10.1128/CVI.00145-09
15. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Prim.* Macmillan Publishers Limited; 2018;4: 1–22. doi:10.1038/nrdp.2018.10
16. Steinberg MH. Pathophysiology of sickle cell disease. *Baillieres Clin Haematol.* 1998;11: 163–184. doi:10.1016/S0950-3536(98)80074-7
17. Vekilov PG. Sickle-cell haemoglobin polymerization: Is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? *Br J Haematol.* 2007;139: 173–184. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06794.x
18. Alayash AI. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. *Blood Cells, Mol Dis.* Elsevier; 2018;70: 78–86. doi:10.1016/j.bcnd.2017.05.009
19. CROSBY W. Seminars on the Hemolytic of Hemoglobin Anemias and Bile The Metabolism Pigment in Hemolytic. *Am J Med.* 1955;
20. Bunn HF, Nathan DG, Dover GJ, Hebbel RP, Platt OS, Rosse WF, et al. Pulmonary hypertension and nitric oxide depletion in sickle cell disease. *Blood.* 2010;116: 687–692. doi:10.1182/blood-2010-02-268193
21. Gladwin MT, Ofori-Acquah SF. Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. *Blood.* 2014;123: 3689–3690. doi:10.1182/blood-2014-03-563874
22. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest.* 2017;127: 750–760. doi:10.1172/JCI89741
23. Beers EJ Van, Yang Y, Raghavachari N, Tian X, Allen DT, Nichols JS, et al. Iron, Inflammation, and Early Death in Adults With Sickle Cell Disease. *Clin Track.* 2014; 298–306. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304577
24. Vingert B, Tamagne M, Desmarets M, Pakdaman S, Elayeb R, Habibi A, et al. Partial dysfunction of Treg activation in sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2014;89: 261–266. doi:10.1002/ajh.23629

25. Vingert B, Tamagne M, Pakdaman S, Ripa J, Elayeb R, Habibi A, et al. Phenotypic differences of CD4 + T cells in response to red blood cell immunization in transfused sickle cell disease patients. *Eur J Immunol.* 2015;45: 1868–1879. doi:10.1002/eji.201445187
26. Xu H, Wandersee NJ, Guo Y, Jones DW, Holzhauer SL, Hanson MS, et al. Sickle cell disease increases high mobility group box 1: a novel mechanism of inflammation. *Blood.* 2014;124: 3978–3982. doi:10.1182/blood-2014-04-560813.The
27. Balandya E, Reynolds T, Obaro S, Makani J, Francisco S, States U, et al. Alteration of Lymphocyte Phenotype and Function in Sickle Cell Anemia: Implications for Vaccine Responses. *Am J Hematol.* 2017;91: 938–946. doi:10.1002/ajh.24438.Alteration
28. Cesar P, Dhyani A, Augusto Schwade L, Acordi P, Xerez Albuquerque C, Nina R, et al. Epidemiological, clinical, and severity characterization of sickle cell disease in a population from the Brazilian Amazon. *Hematol Oncol Stem Cell Ther. King Faisal Specialist Hospital & Research Centre;* 2019; 1–6. doi:10.1016/j.hemonc.2019.04.002
29. Luiza-Silva M, Campi-Azevedo AC, Batista MA, Martins MA, Avelar RS, Silveira Lemos da D, et al. Cytokine Signatures of Innate and Adaptive Immunity in 17DD Yellow Fever Vaccinated Children and Its Association With the Level of Neutralizing Antibody. *J Infect Dis.* 2011;204: 873–883. doi:10.1093/infdis/jir439
30. Taylor R. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. *J Diagnostic Med Sonogr.* 1990; doi:10.1177/875647939000600106
31. Williams TN, Thein SL. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2018;19: 113–147. doi:10.1146/annurev-genom-083117-021320
32. Koffi KG, Sawadogo D, Meite M, Nanho DC, Tanoh ES, Attia AK, et al. Reduced levels of T-cell subsets CD4 p and CD8 p in homozygous sickle cell anaemia patients with splenic defects. 2003; 363–365. doi:10.1038/sj.thj.6200310
33. Kaaba SA, Al-Harbi SA. Reduced levels of CD2+ cells and T-cell subsets in patients with sickle cell anaemia. *Immunol Lett.* 1993;37: 77–81. doi:10.1016/0165-2478(93)90135-O
34. Adedeji M. Lymphocytes Subpopulation in Homozygous Sickle Cell Anaemia. *Acta Haematol.* 1985;74: 10–13.
35. Rêgo MJBM, da Silva RR, Pereira MC, da Silva Araújo A, Pitta I da R, Falcão DA, et

- al. Evaluation of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T cell populations, IL-10 production, and their correlation with clinical and biochemical parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine*. 2015;75: 310–5. doi:10.1016/j.cyto.2015.07.016
36. Platt OS, Platt OS. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *J Clin Invest*. 106.
 37. Chen G, Chang J, Zhang D, Pinho S, Jang J, Frenette PS. Targeting Mac-1-mediated leukocyte – RBC interactions uncouples the benefits for acute vaso-occlusion and chronic organ damage. *Exp Hematol*. ISEH - International Society for Experimental Hematology; 2016;44: 940–946. doi:10.1016/j.exphem.2016.06.252
 38. Lancelot M, White J, Sarnaik S, Hines P. Low molecular weight heparin inhibits sickle erythrocyte adhesion to VCAM-1 through VLA-4 blockade in a standardized microfluidic flow adhesion assay. *British J Haematol*. 2017;178: 476–491.
 39. Canalli AA, Proença RF, Franco-penteado CF, Traina F, Sakamoto TM, Saad STO, et al. Original Articles Participation of Mac-1, LFA-1 and VLA-4 integrins in the in vitro adhesion of sickle cell disease neutrophils to endothelial layers, and reversal of adhesion by simvastatin. 2011;96: 526–533. doi:10.3324/haematol.2010.032912
 40. Hosoi H, Ikeda H, Imai N, Amaike C, Wang L, Orito Y, et al. Stimulation through very late antigen-4 and -5 improves the multifunctionality and memory formation of CD8+ T cells. *Eur J Immunol*. 2014;44: 1747–1758. doi:10.1002/eji.201343969
 41. Rautonen N, Martin NL, Rautonen J, Rooks Y, Mentzer WC, Wara DW. Low number of antibody producing cells in patients with sickle cell anemia. *Immunol Lett*. 1992;34: 207–212.
 42. Wang WC, Herrod HG, Valenski WR, Robert J. Lymphocyte and Complement Abnormalities in Splenectomized Patients With Hematologic Disorders. 1988;245: 239–245.
 43. Venkataraman M, Sc B V, Sc M, Ph D, Westerman MP. B-Cell Changes Occur in Patients with Sickle Cell Anemia. *Am J Clin Pathol*. 1985;84: 153–158.
 44. Bao W, Zhong H, Manwani D, Vasovic L, Uehlinger J, Lee MT, et al. Regulatory B-cell compartment in transfused alloimmunized and non-alloimmunized patients with sickle cell disease. 2013; 736–740. doi:10.1002/ajh.23488
 45. Wong W, Zhou Y, Operskalski EA, Hassett J, Powars DR, Mosley JW, et al. Hematologic Profile and Lymphocyte Subpopulations in Hemoglobin SC Disease :

- Comparison With Hemoglobin SS and Black Controls. 1996;154: 150–154.
46. Anyaegbu CC, Okpala IE, Aken'Ova YA, Salimonu LS. Peripheral blood neutrophil count and candidacidal activity correlate with the clinical severity of sickle cell anaemia (SCA). *Eur J Haematol.* 2010;60: 267–268. doi:10.1111/j.1600-0609.1998.tb01036.x
 47. Hendrickson JE, Yee MEM, Winkler AM, Fasano RM, Kean LS, Nickel RS, et al. Immunophenotypic parameters and RBC alloimmunization in children with sickle cell disease on chronic transfusion. *Am J Hematol.* 2015;90: 1135–1141. doi:10.1002/ajh.24188
 48. Wongtong N, Jones S, Deng Y, Cai J, Ataga K. Monocytosis is associated with hemolysis in sickle cell disease. *Hematology.* 2015;0: 1–5. doi:10.1179/1476830515Y.0000000001
 49. Wun T, Cordoba M, Rangaswami A, Cheung AW, Paglieroni T. Activated monocytes and platelet-monocyte aggregates in patients with sickle cell disease. *Clin Lab Haematol.* 2002;24: 81–88. doi:10.1046/j.1365-2257.2002.00433.x
 50. Lard LR, Mul FPJ, Haas M De, Roos D, Duits AJ. Neutrophil activation in sickle cell disease. *J Leucoc Biol.* 1999;66: 411–415.
 51. Kerst JM, de Haas M, van der Schoot CE, Slaper-Cortenbach IC, Kleijer M, von dem Borne AE, et al. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: induction of immunophenotypically and functionally altered neutrophils via an effect on myeloid progenitor cells. *Blood.* 1993;82: 3265–3272.
 52. Singhal R, Chawla S, Rathore DK, Bhasym A, Annarapu GK, Sharma V, et al. Development of pro-inflammatory phenotype in monocytes after engulfing Hb-activated platelets in hemolytic disorders. *Clin Immunol.* Elsevier Inc.; 2017;175: 133–142. doi:10.1016/j.clim.2016.12.007
 53. Annarapu GK, Singhal R, Gupta A, Chawla S, Batra H, Seth T, et al. HbS Binding to GP1b α Activates platelets in sickle cell disease. *PLoS One.* 2016;11: 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0167899
 54. Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. B-1 B Cell Development in the Fetus and Adult. *Immunity.* Elsevier Inc.; 2012;36: 13–21. doi:10.1016/j.immuni.2011.11.017
 55. Prieto JMB, Felipe MJB. Development, phenotype, and function of non-conventional B cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* Elsevier; 2017;54: 38–44.

doi:10.1016/j.cimid.2017.08.002

56. Paglieroni T., Ward J, Holland P. Changes in peripheral blood CD5 (Bla) B-cell populations and autoantibodies following blood transfusion. *Transfusion*. 1995;35: 189–198.
57. Pitanga TN, Oliveira RR, Zanette DL, Guarda CC, Santiago RP, Santana SS, et al. Sickle red cells as danger signals on proinflammatory gene expression, leukotriene B4 and interleukin-1 beta production in peripheral blood mononuclear cell. *Cytokine*. Elsevier Ltd; 2016;83: 75–84. doi:10.1016/j.cyto.2016.03.016
58. Vanhinsbergh LJ, Powe DG, Jones NS. Reduction of TLR2 gene expression in allergic and nonallergic rhinitis. *Ann Allergy, Asthma Immunol. American College of Allergy, Asthma & Immunology*; 2007;99: 509–516. doi:10.1016/S1081-1206(10)60379-1
59. Lichte P, Steiner EM, Grigoleit J-S, Oberbeck R, Kullmann JS, Schedlowski M, et al. Low dose LPS does not increase TLR4 expression on monocytes in a human in vivo model. *Cytokine*. Elsevier Ltd; 2013;63: 74–80. doi:10.1016/j.cyto.2013.04.014
60. Ganley-Leal LM, Liang YM, Jagannathan-Bogdan M, Farraye FA, Nikolajczyk Barbara S. BS. Differential regulation of TLR4 expression in human B cells and monocytes. *Mol Immunol*. Elsevier Ltd; 2010;48: 82–88. doi:10.1016/j.molimm.2010.09.008
61. Al-Humood S, Zueriq R, Al-Faris L, Marouf R, Al-Mulla F. Circulating cell-free DNA in sickle cell disease: Is it a potentially useful biomarker? *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138: 678–683. doi:10.5858/arpa.2012-0725-OA
62. Tsuji N, Tsuji T, Ohashi N, Kato A, Fujigaki Y, Yasuda H. Role of Mitochondrial DNA in Septic AKI via Toll-Like Receptor 9. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27: 2009–2020. doi:10.1681/ASN.2015040376
63. Martin-Orozco E, Kobayashi H, Van Uden J, Nguyen MD, Kornbluth RS, Raz E. Enhancement of antigen-presenting cell surface molecules involved in cognate interactions by immunostimulatory DNA sequences. *Int Immunol*. 1999;11: 1111–1118. doi:10.1093/intimm/11.7.1111
64. Sánchez-Zauco N, Rio-Navarro B Del, Gallardo-Casas C, Del Rio-Chivardi J, Muriel-Vizcaino R, Rivera-Pazos C, et al. High expression of Toll-like receptors 2 and 9 and Th1/Th2 cytokines profile in obese asthmatic children. *Allergy Asthma Proc*. 2014;35: 34–41. doi:10.2500/aap.2014.35.3749

65. URBAN BC, MACHARIA A, WILLIAMS TN, LOWE B, SHAFI MJ, CORDERY D V., et al. Frequencies of Peripheral Blood Myeloid Cells in Healthy Kenyan Children With A+ Thalassemia and the Sickle Cell Trait. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;74: 578–584. doi:10.4269/ajtmh.2006.74.578
66. Elalfy MS, Abdel A, Adly M, Soliman F, Ebeid E, Eissa DS, et al. Immunological role of CD4 + CD28 null T lymphocytes , natural killer cells , and interferon-gamma in pediatric patients with sickle cell disease : relation to disease severity and response to therapy. *Immunologic Research*; 2018;
67. Wallace KL, Linden J. Adenosine A_{2A} receptors induced on iNKT and NK cells reduce pulmonary inflammation and injury in mice with sickle cell disease. 2019;116: 5010–5021. doi:10.1182/blood-2010-06-290643.The
68. Kaplan J, Sarnaik S, Gitlin J, Lusher J. Diminished Helper/Supressor Lymphocyte Raios and Natural Killer Activity i Recipients of Repeated Blood Transfusions. *Blood.* 1984;64: 308–310.
69. Pitanga TN, Vilas-Boas W, Cerqueira BAV, Seixas MO, Barbosa CG, Adorno EV, et al. Cytokine profiles in sickle cell anemia: Pathways to be unraveled. *Adv Biosci Biotechnol.* 2013;04: 6–12. doi:10.4236/abb.2013.47A1002
70. Taylor SC. b, Shacks SJ., Qu Z. In vivo production of type 1 cytokines in healthy sickle cell disease patients. *J Natl Med Assoc.* 1999;91: 619–624.
71. Pathare A, Al Kindi S, Alnaqdy AA, Daar S, Knox-Macaulay H, Dennison D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Am J Hematol.* 2004;77: 323–328. doi:10.1002/ajh.20196
72. Read KA, Powell MD, McDonald PW, Oestreich KJ. IL-2, IL-7, and IL-15: Multistage regulators of CD4+ T helper cell differentiation. *Exp Hematol. ISEH - International Society for Experimental Hematology*; 2016;44: 799–808. doi:10.1016/j.exphem.2016.06.003
73. Bouchnita A, Miossec P, Tosenberger A, Volpert V. Modeling of the effects of IL-17 and TNF- α on endothelial cells and thrombus growth. *Comptes Rendus - Biol. Académie des sciences*; 2017;340: 456–473. doi:10.1016/j.crvi.2017.10.002
74. Mendonça R, Silveira AAA, Conran N. Red cell DAMPs and inflammation. *Inflamm Res.* 2016;65: 665–678. doi:10.1007/s00011-016-0955-9

75. Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad STO, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol.* 2009;85: 235–242. doi:10.1189/jlb.0708445
76. Selvaraj SK, Giri RK, Perelman N, Johnson C, Malik P, Kalra VK. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood.* 2003;102: 1515–1524. doi:10.1182/blood-2002-11-3423
77. Zhang D, Xu C, Manwani D, Frenette PS. Neutrophils , platelets , and in fl ammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood J.* 2016;127: 801–810. doi:10.1182/blood-2015-09-618538.
78. Zhang D, Xu C, Manwani D, Frenette PS. Neutrophils , platelets , and in fl ammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. 2016;127: 801–810. doi:10.1182/blood-2015-09-618538.
79. Duits AJ, Schnog JB, Lard LR, Saleh AW, Rojer RA. Elevated IL-8 levels during sickle cell crisis. *Eur J Haematol.* 2010;61: 302–305. doi:10.1111/j.1600-0609.1998.tb01092.x
80. Hazin-Costa MF, da Silva Araújo A, Guerra GL, da Matta MC, Torres LC, Souza AI. Chemokines in pregnant women with sickle cell disease. *Cytokine.* Elsevier; 2019;113: 195–199. doi:10.1016/j.cyto.2018.07.002
81. Schaller TH, Batich KA, Suryadevara CM, Desai R, Sampson JH. Chemokines as adjuvants for immunotherapy: implications for immune activation with CCL3. *Expert Rev Clin Immunol.* 2017;13: 1049–1060. doi:10.1080/1744666X.2017.1384313
82. Wu B, Wang W, Zhan Y, Li F, Zou S, Sun L, et al. CXCL13, CCL4, and sTNFR as circulating inflammatory cytokine markers in primary and SLE-related autoimmune hemolytic anemia. *J Transl Med.* 2015;13: 1–7. doi:10.1186/s12967-015-0474-4
83. Klinger MH., Wilhelm D, Budel S, Sticherling M, Schröder J., Kühnel W. Immunocytochemical localization of chemokines RANTES and MIP-alpha within Human Platelets and their release during storage. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995;107: 541–546.
84. Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1)/CCL2 as a biomarker in Acute Coronary Syndromes. *Curr Atheroscler Rep.* 2009;11: 131–138.

85. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interf Cytokine Res.* 2009;29: 313–326. doi:10.1089/jir.2008.0027
86. Shokawa T, Yoshizumi M, Yamamoto H, Omura S, Toyofuku M. Induction of Heme Oxygenase-1 Inhibits Monocyte Chemoattractant Protein-1 mRNA Expression in U937 Cells. *J Pharmacol Sci.* 2006;166: 162–166.
87. Bains SK, Foresti R, Howard J, Atwal S, Green CJ, Motterlini R. Human Sickle Cell Blood Modulates Endothelial Heme Oxygenase Activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 305–312. doi:10.1161/ATVBAHA.109.196360
88. Driss A, Wilson NO, Mason K, Hyacinth HI, Hibbert JM, Serjeant GR, et al. Elevated IL-1 α and CXCL10 serum levels occur in patients with homozygous sickle cell disease and a history of acute splenic sequestration. *Dis Markers.* 2012;32: 295–300. doi:10.3233/DMA-2011-0888
89. Durpès M, Nebor D, Couespel P, Mougengel D, Decastel M, Elion J, et al. Blood Cells , Molecules , and Diseases Effect of interleukin-8 and RANTES on the Gardos channel activity in sickle human red blood cells : Role of the Duffy antigen receptor for chemokines. *Blood Cells Mol Dis. Elsevier Inc.;* 2010;44: 219–223. doi:10.1016/j.bcnd.2010.02.001
90. Mikolajczyk TP, Nosalski R, Szczepaniak P, Budzyn K, Osmenda G, Skiba D, et al. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation , T-cell accumulation , and vascular dysfunction in hypertension. *FASEB J.* 2016; 1–13. doi:10.1096/fj.201500088R
91. Raghupathy R, Haider M., Azizieh F, Abdelsalam R, D`Souza T. Th1 and Th2 Cytokine Profiles in Sickle Cell Disease. *Acta Haematol.* 2000;103: 197–202.
92. Taylor SC, Shacks SJ, Qu Z, Wiley P. Type 2 cytokine serum levels in healthy sickle cell disease patients. *J Natl Med Assoc.* 1997;89: 753–7.
93. Cavalcante JEA, MacHado RPG, Laurentino MR, De Jesus Dos Santos TE, Bandeira ICJ, Filho PAM, et al. Clinical events and their relation to the tumor necrosis factor- α and interleukin-10 genotypes in Sickle-Cell-Anemia patients. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2016;9: 14–19. doi:10.1016/j.hemonc.2015.11.002
94. Veiga PC, Freire SM, Schroth RJ, Nogueira-Filho G, Guedes R. Serum cytokine profile

- among Brazilian children of African descent with periodontal inflammation and sickle cell anaemia. *Arch Oral Biol.* Elsevier Ltd; 2012;58: 505–510. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.11.006
95. Reading JL, Vaes B, Hull C, Sabbah S, Hayday T, Wang NS, et al. Suppression of IL-7-dependent Effector T-cell expansion by multipotent adult progenitor cells and PGE₂. *Mol Ther.* 2015;23: 1783–1793. doi:10.1038/mt.2015.131
96. Antwi-Boasiako C, Frimpong E, Gyan B, Kyei-Baafour E, Sey F, Dzudzor B, et al. Elevated Proangiogenic Markers are Associated with Vascular Complications within Ghanaian Sickle Cell Disease Patients. *Med Sci.* 2018;6: 1–9. doi:10.3390/medsci6030053
97. Gürkan E, Tanriverdi K, Başlamışli F. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor levels in sickle cell disease. *Ann Hematol.* 2005;84: 71–75. doi:10.1007/s00277-004-0935-y
98. Solovey A, Gui L, Ramakrishnan S, Steinberg MH, Hebbel RP, Parise E. Sickle cell anemia as a possible state of enhanced anti-apoptotic tone: survival effect of vascular endothelial growth factor on circulating and unanchored endothelial cells. *Blood.* 1999;93: 3824–30.
99. Cao J, Mathews MK, McLeod DS, Merges C, Hjelmeland LM, Luty GA. Angiogenic factors in human proliferative sickle cell retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 1999;83: 838–846. doi:10.1136/bjo.83.7.838
100. Hatzipantelis ES, Pana ZD, Gombakis N, Taparkou A, Tzimouli V, Kleta D, et al. Endothelial activation and inflammation biomarkers in children and adolescents with sickle cell disease. *Int J Hematol.* 2013;98: 158–163. doi:10.1007/s12185-013-1392-y
101. Conran N, Saad STO, Costa FF, Ikuta T. Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease. *Ann Hematol.* 2007;86: 255–261. doi:10.1007/s00277-006-0246-6
102. Chinnasamy D, Yu Z, Kerkar SP, Zhang L, Morgan RA, Restifo NP, et al. Local Delivery of Interleukin-12 Using T Cells Targeting VEGF Receptor-2 Eradicates Multiple Vascularized Tumors in Mice. *Clin Cancer Res.* 2012;18: 1672–1683. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-3050.Local

FIGURES

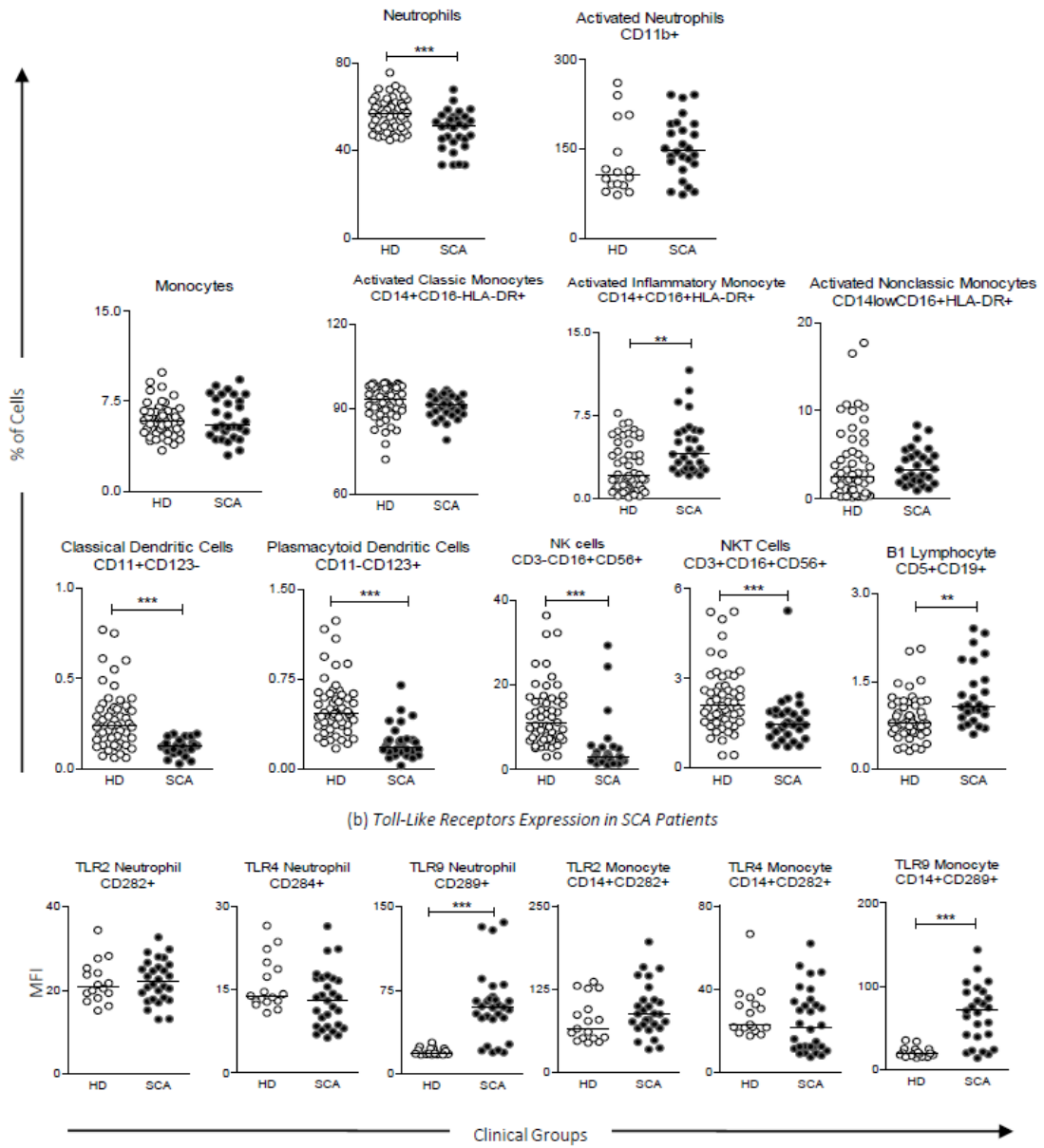


Fig.1

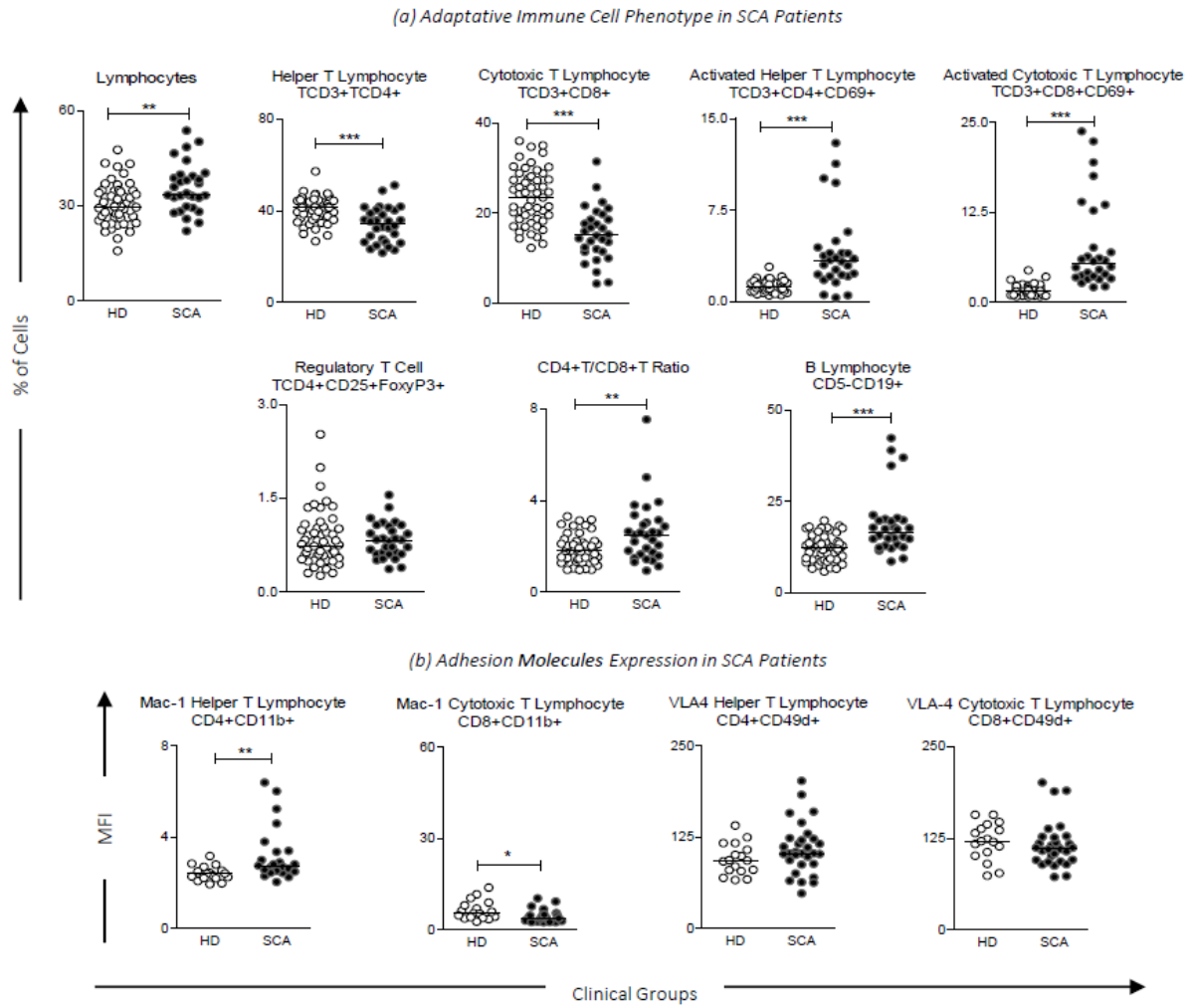


Fig.2

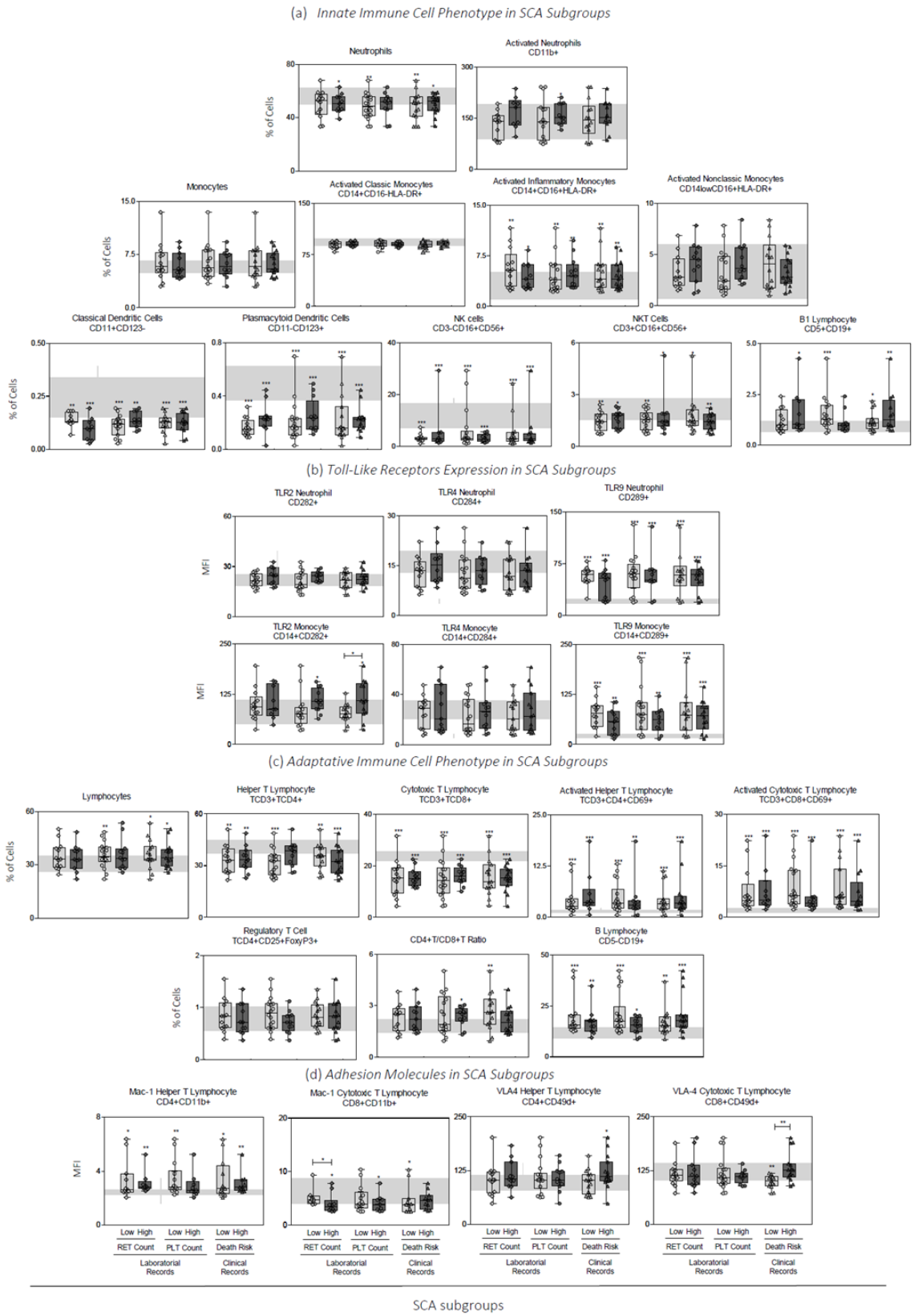


Fig.3

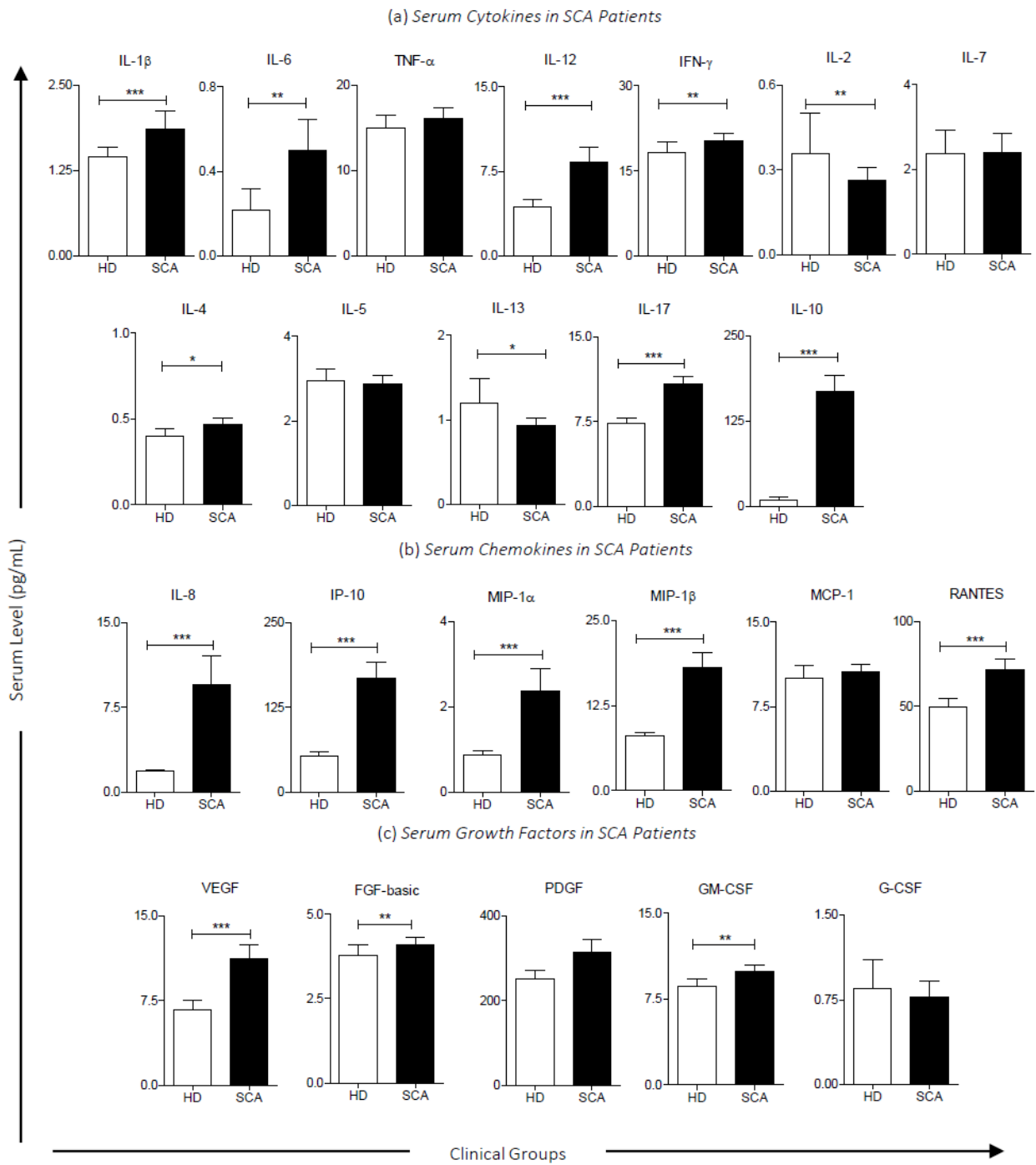


Fig.4

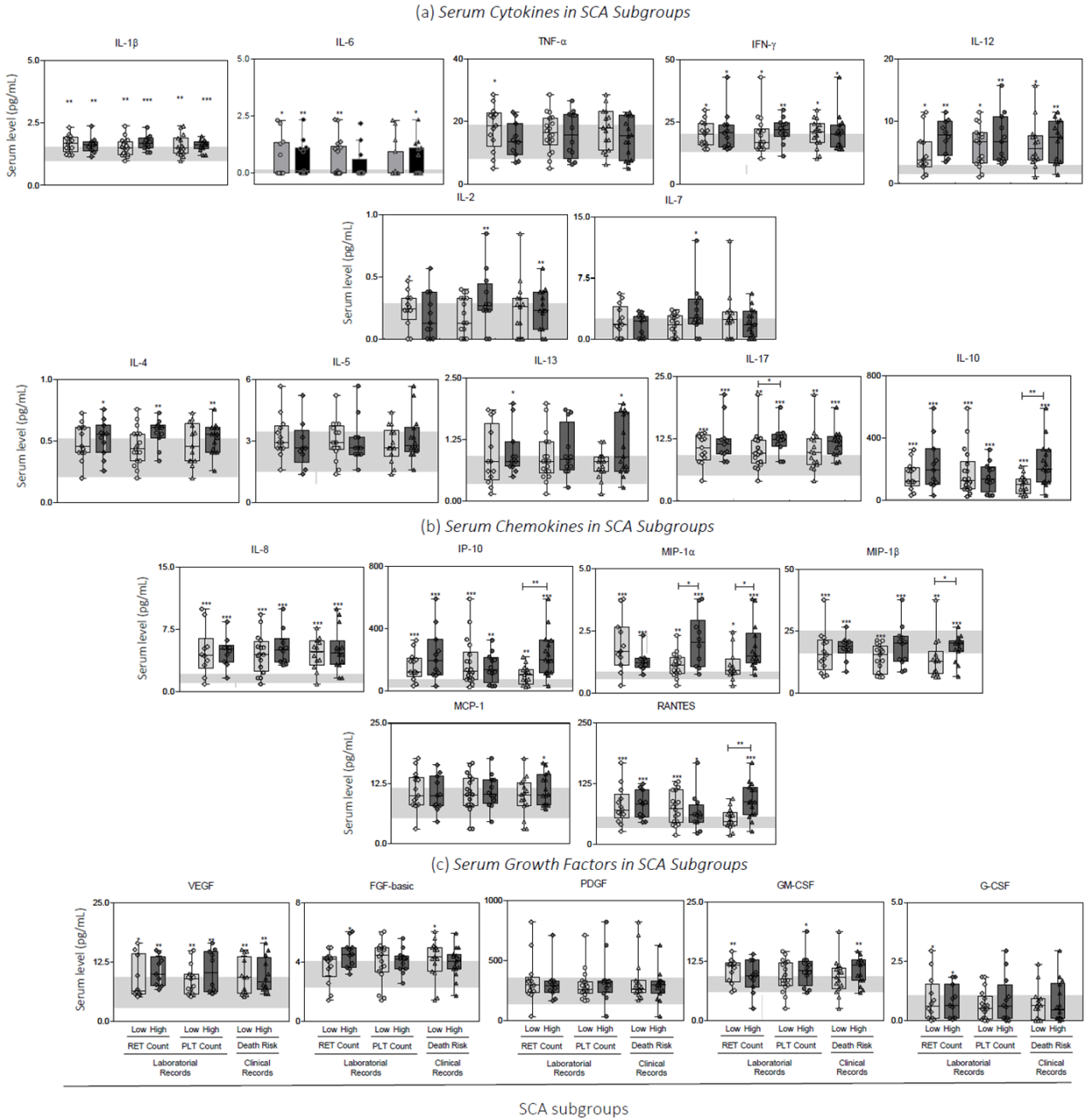


Fig. 5

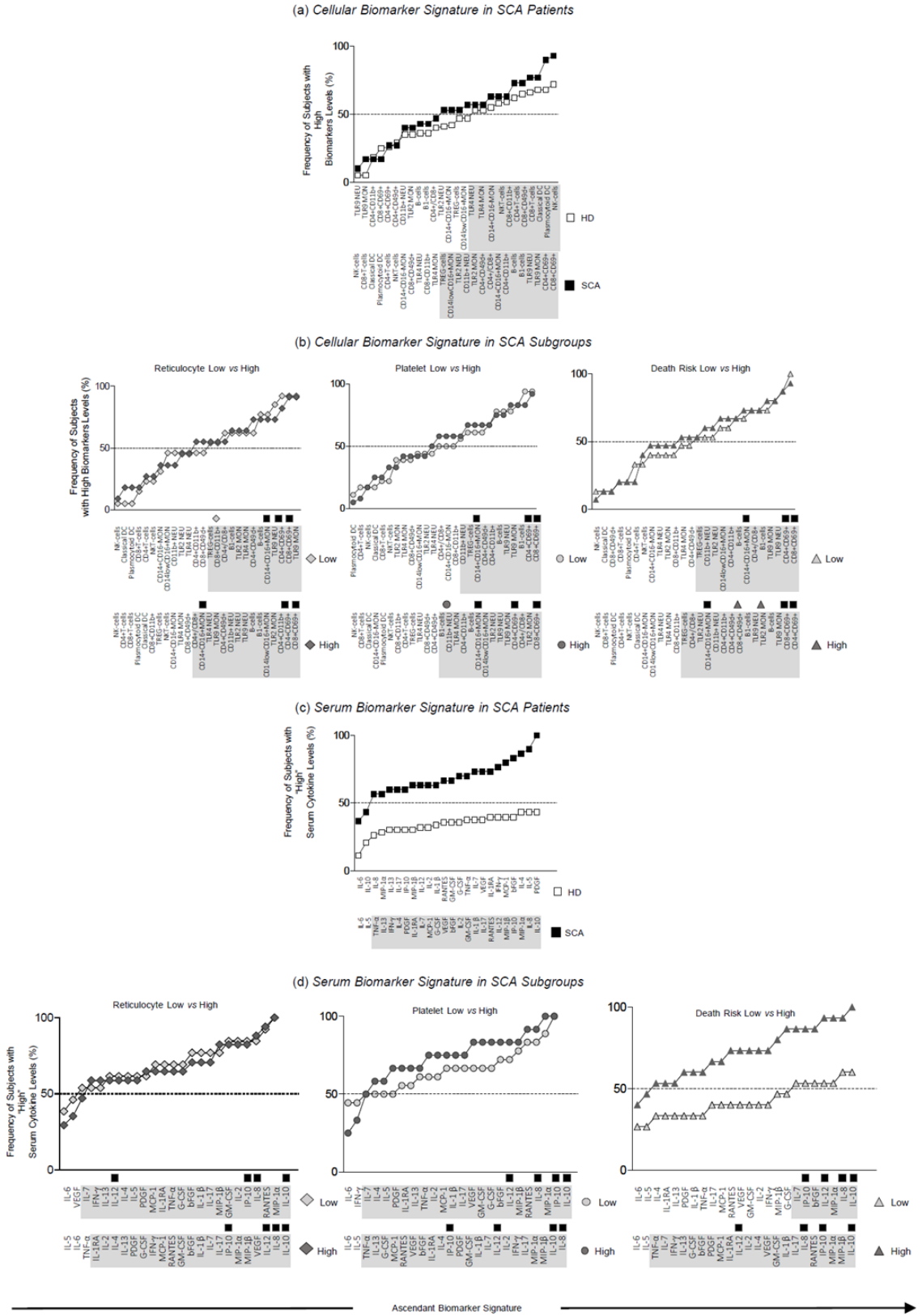
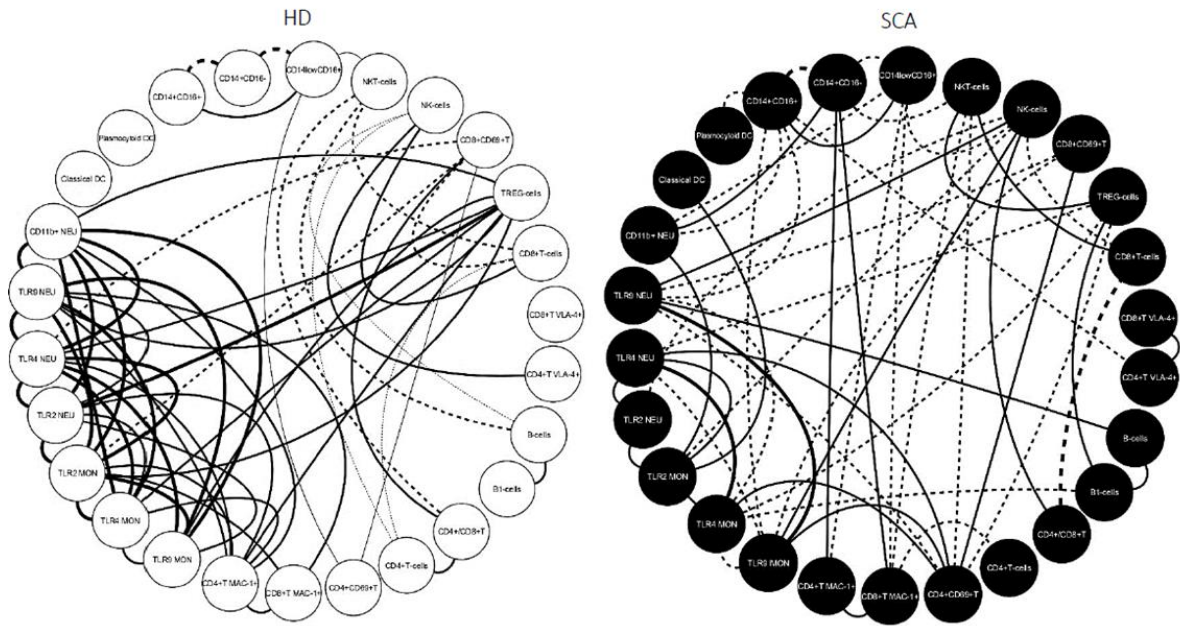
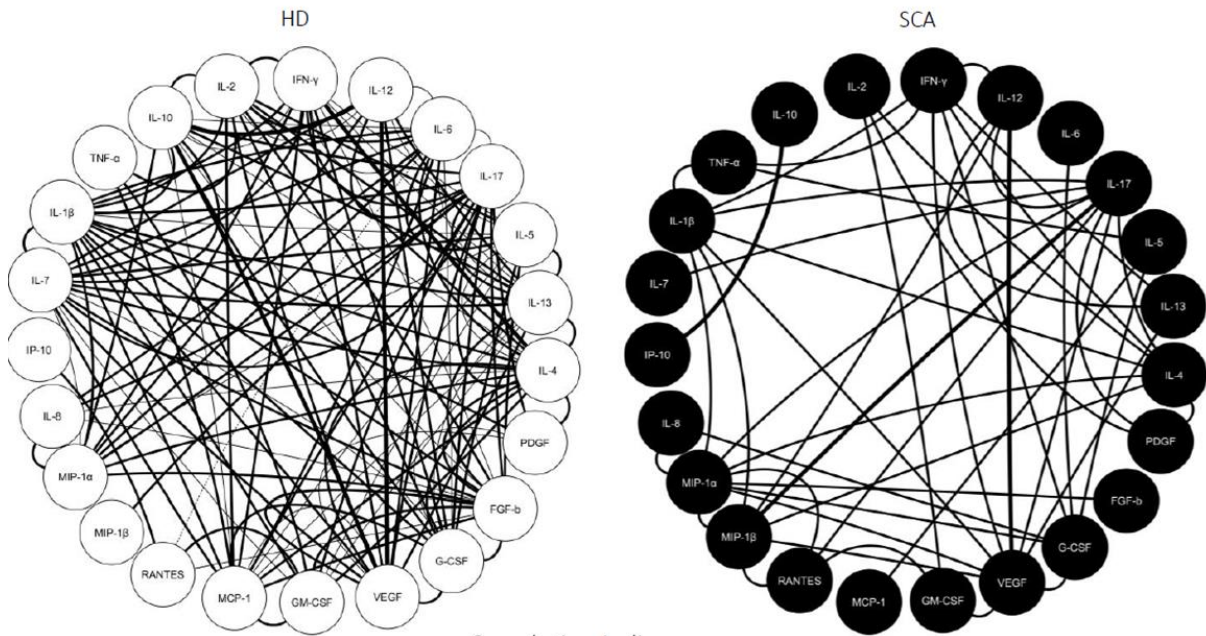


Fig.6

(a) Cellular Biomarker Networks in Sickle Cell Anemia



(b) Serum Biomarker Networks in Sickle Cell Anemia



Correlation Indices

- Negative Weak ($r > -0,36$)
- - - - - Negative Moderate ($-0,68 \geq r \geq -0,36$)
- Negative Strong ($r \leq -0,68$)
- Positive Weak ($r < 0,36$)
- Positive Moderate ($0,36 \geq r \geq 0,68$)
- Positive Strong ($r \geq 0,68$)

Fig.7

Serum Biomarker Networks in Sickle Cell Anemia Subgroups

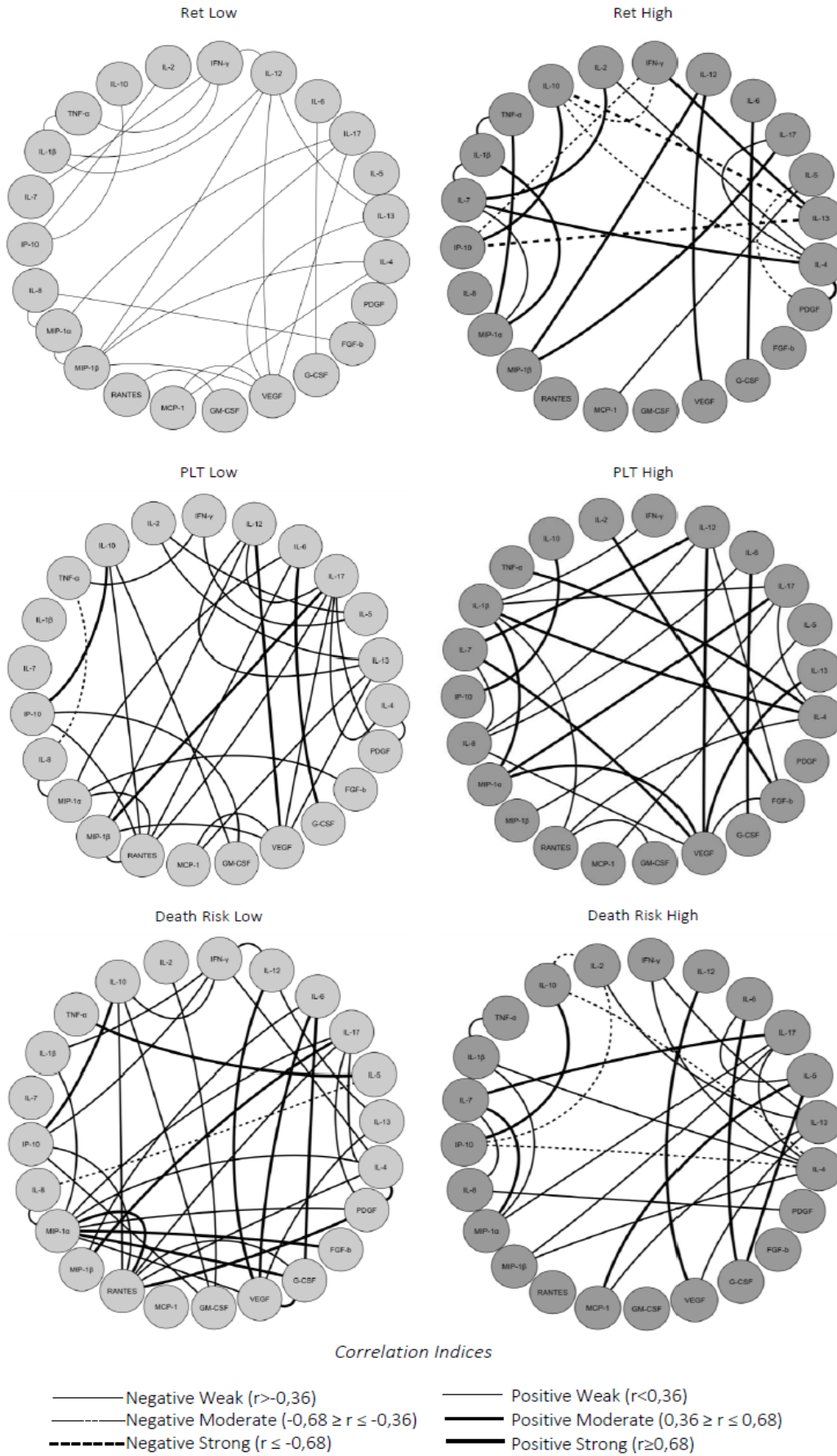


Fig.9

FIGURES LEGENDS

Figure 1: *Phenotype profile of innate immunity in SCA patients.* The frequency of cell phenotypes (a) and toll-like receptors expression (b) were measured in peripheral blood of SCA patients and healthy donors by flow cytometry. The results are shown in scatter plots with individual values and the median percentage of cells or mean fluorescence intensity (MFI) represented as a line. Significant differences ($p < 0.05$) are highlighted by connecting lines and asterisks (*) for comparisons with the HD group.

Figure 2: *Phenotype profile of adaptive immunity in SCA patients.* The frequency of cell phenotypes (a) and adhesion molecule expression (b) were measured in peripheral blood of SCA patients and healthy donors by flow cytometry. The results are shown in scatter plots with individual values and the median percentage of cells or mean fluorescence intensity (MFI) represented as a line. Significant differences ($p < 0.05$) are highlighted by connecting lines and asterisks (*) for comparisons with the HD group.

Figure 3: *Phenotype profile of innate and adaptive immunity components in SCA subgroups according to laboratorial and clinical records.* The frequency of cell phenotypes (a), the expression of toll-like receptors (b) by innate immunity cells along with the cell phenotypes (c) and the expression of adhesion molecules by adaptive immunity cells (d) were analyzed in SCA subgroups by flow cytometry. The SCA patients were categorized according to their laboratorial and clinical records, including: reticulocyte counts, platelet levels and death risk scores. The results are presented in box plots with median and interquartile range overlaid by scatter plots with individual values for cell phenotype or mean fluorescence intensity (MFI). The interquartile ranges (25th-75th) for results observed in HD were used as reference range (gray background). Significant differences ($p < 0.05$) are highlighted by connecting lines and asterisks (*).

Figure 4: *Serum immunological biomarkers in sickle cell anemia patients.* The levels of cytokines (a), chemokines (b) and growth factors (c) were measured in serum of SCA patients

and healthy donors by Luminex assay. The results are shown in bars charts with mean \pm standard deviation for serum concentration (pg/mL). Significant differences ($p < 0.05$) are highlighted by connecting lines and asterisks (*).

Figure 5: *Serum immunological biomarkers in sickle cell anemia patients according to laboratorial and clinical records.* The levels of cytokines (a), chemokines (b) and growth factors (c) were measured in serum of SCA subgroups by Luminex assay. The SCA patients were categorized according to their laboratorial and clinical records, including: reticulocyte counts, platelet levels and death risk scores. The results are presented in box plots with median and interquartile range overlaid by scatter plots with individual serum concentration (pg/mL). The interquartile ranges (25th-75th) for results observed in HD were used as reference range (gray background). Significant differences ($p < 0.05$) are highlighted by connecting lines and asterisks (*).

Figure 6: *Signatures of cell phenotypes features and serum immunological biomarkers in patients with sickle cell anemia according to laboratorial and clinical records.* The signatures of cell phenotype features (a, b) and serum immunological biomarkers (c, d) were assembled considering the frequency of subjects with values above the global median cut-off determined for each biomarker. The SCA patients were categorized according to their laboratorial and clinical records, including: reticulocyte counts, platelet levels and death risk scores. The global median values for each biomarker were used as the cut-off to classify each subjects with “low” or “high” biomarker levels. Overlay of ascendant biomarker signature curves were employed to identify those biomarkers with frequency of subjects above the 50th percentile (dashed lines) further highlighted by gray background. Venn diagram analysis were carried out to identify those biomarkers commonly or selectively observed amongst groups. The universal biomarkers observed in all SCA subgroups were tagged by black squares. Those biomarkers with putative association with SCA subgroups were tagged with a gray diamond for SCA patients with low

reticulocyte counts, a dark gray circle for SCA patients with high platelet counts or a dark gray triangle for SCA patients with high death risk.

Figure 7: *Cellular and serum biomarker networks in SCA patients.* Customized biomarker network layouts for SCA (black nodes) and HD (white nodes) were assembled to identify the relevant association between innate and adaptive cell phenotypes (a) and serum biomarkers (b) using circular distribution of nodes. Significant Spearman's correlations at $p < 0.05$ were represented by connecting edges to highlight positive [strong ($r \geq 0,68$; thick continuous line) or moderate ($0,36 \geq r \leq 0,68$; not so thick continuous line) or weak ($r < 0,36$; thin continuous line)] and negative [strong ($r \leq -0,68$; thick dashed line) or moderate ($-0,68 \geq r \leq -0,36$; not so thick dashed line) or weak ($r > -0,36$; thin dashed line)] as proposed by Taylor et al [30].

Figure 8: *Cell phenotypes networks in patients with sickle cell anemia according to laboratorial and clinical records.* The SCA patients were categorized according to their laboratorial and clinical records, including: reticulocyte counts (RET) platelet levels (PLT) and death risk scores. Customized biomarker network layouts were assembled to identify the relevant association between innate and adaptive cell phenotypes for SCA patients with low (light gray nodes) or high (dark gray nodes) clinical and laboratorial records were assembled to identify the relevant association between innate and adaptive cells using circular distribution of nodes. Significant Spearman's correlations at $p < 0.05$ were represented by connecting edges to highlight positive [strong ($r \geq 0,68$; thick continuous line) or moderate ($0,36 \geq r \leq 0,68$; not so thick continuous line) or weak ($r < 0,36$; thin continuous line)] and negative [strong ($r \leq -0,68$; thick dashed line) or moderate ($-0,68 \geq r \leq -0,36$; not so thick dashed line) or weak ($r > -0,36$; thin dashed line)] as proposed by Taylor et al [30].

Figure 9: *Serum biomarker networks in patients with sickle cell anemia according to laboratorial and clinical records.* The SCA patients were categorized according to their laboratorial and clinical records, including: reticulocyte counts (RET) platelet levels (PLT) and death risk scores. Customized biomarker network layouts were assembled to identify the

relevant association between innate and adaptative cell phenotypes for SCA patients with low (light gray nodes) or high (dark gray nodes) clinical and laboratorial records were assembled to identify the relevant association between serum cytokines, chemokines and growth factors using circular distribution of nodes. Significant Spearman's correlations at $p < 0.05$ were represented by connecting edges to highlight positive [strong ($r \geq 0,68$; thick continuous line) or moderate ($0,36 \geq r \leq 0,68$; not so thick continuous line) or weak ($r < 0,36$; thin continuous line)] and negative [strong ($r \leq -0,68$; thick dashed line) or moderate ($-0,68 \geq r \leq -0,36$; not so thick dashed line) or weak ($r > -0,36$; thin dashed line)] as proposed by Taylor et al [30].

5. CONCLUSÃO

Esse estudo forneceu resultados relevantes sobre o envolvimento de componentes das imunidades inata e adaptativa nas condições de reticulocitose e trombocitose, as quais são características importantes da fisiopatologia relacionadas a hemólise e hemostasia, e quanto a gravidade clínica da anemia falciforme em estado estacionário. Concluímos que:

- Na fisiopatologia da anemia falciforme em estado estacionário o perfil fenotípico formado por células ativadas da imunidade adaptativa parece se destacar em comparação as células da imunidade inata;

- Observamos uma frequência maior na AF de linfócitos TCD4 e TCD8 ativados, linfócitos B e maior expressão da molécula Mac-1 nos linfócitos TCD4 e quanto as células da imunidade inata de monócitos inflamatórios e linfócitos B1 e maior expressão de TLR9 tanto em neutrófilos quanto em monócitos;

- Linfócito TCD4⁺ ativado se destaca correlacionando com receptores TLR4 nas condições de alta reticulócitos e alto risco de morte e TLR2 de monócitos na alta trombocitose;

- A fisiopatologia da AF no estado estacionário parece ser controlada por citocinas Th1 e Th17 (IL-12, IFN- γ , IL-1 β , IL-17) e regulatória IL-10, quimiocinas IL-8, e IP-10 e fator de crescimento VEGF como biomarcadores gerais;

- A expressão de TLR2 em monócitos e VLA-4 em linfócitos TCD8⁺ e as quimiocinas MIP- β e RANTES parecem ser relevantes em pacientes com AF com alto risco de morte;

- As condições de alta reticulocitose e alto risco de morte apresentam correlações comuns, parecendo haver uma competição das respostas inflamatórias Th1 e Th17 com Th2.

Todavia, mais estudos abordando os mesmos ou outros biomarcadores nos mesmos pacientes em crise, investigar ativação de vias de sinalização intracelular, análises de expressão gênica de moléculas envolvidas nas respostas imunes inatas e adaptativas são necessários para se conseguir definir um biomarcador seletivo e para se entender melhor esse complexo mecanismo fisiopatológico da anemia falciforme.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. et al. Sickle cell anemia – Nitric oxide related genetic modifiers of hematological and biochemical parameters. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 64, n. 4, p. 957–963, 2016.
- ANVISA. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes**. Brasília: [s.n.].
- ANYAEGBU, C. C. et al. Peripheral blood neutrophil count and candidacidal activity correlate with the clinical severity of sickle cell anaemia (SCA). **European Journal of Haematology**, v. 60, n. 4, p. 267–268, 2010.
- ASLAN, M.; CANATAN, D. Modulation of redox pathways in neutrophils from sickle cell disease patients. **Experimental Hematology**, v. 36, n. 11, p. 1541–1550, 2008.
- BALANDYA, E. et al. Alteration of Lymphocyte Phenotype and Function in Sickle Cell Anemia: Implications for Vaccine Responses. **Am J Hematol**, v. 91, n. 9, p. 938–946, 2017.
- BANDEIRA, I. C. J. et al. Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB*S haplotype. **Cytokine**, v. 65, n. 2, p. 217–221, 2014.
- BEERS, E. J. VAN et al. Iron, Inflammation, and Early Death in Adults With Sickle Cell Disease. **Clinical Track**, p. 298–306, 2014.
- BELCHER, J. D. et al. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. **Blood**, v. 96, n. 7, p. 2451–2459, 2000.
- BELINI JUNIOR, E. et al. Severity of Brazilian sickle cell disease patients : Severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. **Blood Cells, Molecules and Diseases.**, v. 54, p. 321–327, 2015.
- BRAGA, J. A. P. et al. Guidelines on neonatal screening and painful vaso-occlusive crisis in sickle cell disease: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular Project Guidelines: Associação Médica Brasileira - 2016. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, n. 2, p. 147–157, 2016.
- BRASIL, M. DA S. **Doença Falciforme - O que se deve saber sobre herança genética**. [s.l: s.n.].
- BROUSSE, V.; BUFFET, P.; REES, D. The spleen and sickle cell disease : the sick (led) spleen. **British journal of haematology**, v. 166, p. 165–176, 2014.
- BUNN, F. H. Pathogenesis and T Reatment of S Ickle C Ell D Isease. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 762–769, 1997.
- CARVALHO-DOS SANTOS, B. S. et al. Impact of β S-Globin Haplotypes on Oxidative Stress in Patients with Sickle Cell Anemia in Steady State. **Archives of Medical Research**, v. 43, n. 7, p. 536–540, 2012.

- CHAKRAVORTY, S.; WILLIAMS, T. N. Sickle cell disease: A neglected chronic disease of increasing global health importance. **Archives of Disease in Childhood**, v. 100, n. 1, p. 48–53, 2015a.
- CHAKRAVORTY, S.; WILLIAMS, T. N. Sickle cell disease: a neglected chronic disease of increasing global health importance. **Archives of Disease in Childhood**, v. 100, n. 1, p. 48–53, 2015b.
- CHIES, J. A. B.; NARDI, N. B. Sickle cell disease : a chronic inflammatory condition. v. 57, p. 46–50, 2001.
- CHOU, S. . Transfusion therapy for sickle cell disease. **ISBT Science Series**, v. 11, n. S1, p. 263–270, 2016.
- CONRAN, N. 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.
- COSTA, D. et al. Impact of epigenetic mechanisms on therapeutic approaches of hemoglobinopathies. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 55, n. 2, 2015.
- CROIZAT, H. et al. Primitive haematopoietic progenitors in the blood of patients with sickle cell disease appear to be endogenously mobilized. **Br J Haematol**, v. 111, n. 2, p. 491–497, 2000.
- DEAN, A. On a chromosome far , far away : LCRs and gene expression. v. 22, n. 1, 2006.
- DHALIWAL, G.; CORNETT, P. A.; TIERNEY, L. M. Hemolytic anemia. **American Family Physician**, v. 69, n. 11, p. 2599–2606, 2004.
- DRISS, A. et al. Sickle cell disease in the post genomic era: A monogenic disease with a polygenic phenotype. **Genomics Insights**, v. 2, n. 1, p. 23–48, 2009.
- FIELD, J. J.; NATHAN, D. G.; NOEL, W. C. Advances in Sickle Cell Therapies in the Hydroxyurea Era. v. 20, n. 8, p. 37–42, 2014.
- FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Science in medicine Sickle cell disease : old discoveries , new concepts , and future promise. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 850–58 doi:10.1172/JCI30920, 2007.
- FRIEDRISCH, J. R. et al. DNA damage in blood leukocytes of individuals with sickle cell disease treated with hydroxyurea. **Mutation research**, v. 649, n. 1–2, p. 213–20, 2008.
- GLADWIN, M. .; KATO, G. . Hemolysis-associated hypercoagulability in sickle cell disease: the plo (and blood) thickens! **Haematologica**, v. 93, n. 1, p. 1–3, 2008.
- GLADWIN, M. T.; OFORI-ACQUAH, S. F. Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. **Blood**, v. 123, n. 24, p. 3689–3690, 2014.

- GODEFROY, E. et al. Altered heme-mediated modulation of dendritic cell function in sickle cell alloimmunization. **Haematologica**, v. 101, n. 9, p. 1028–1038, 2016.
- HAYNES, J. et al. Activated neutrophil-mediated sickle red blood cell adhesion to lung vascular endothelium: role of phosphatidylserine-exposed sickle red blood cells. **American Journal Physiol Heart Circ Physiol**, v. 291, p. 1679–1685, 2019.
- HERRICK, J. B. Peculiar Elongated and Sickle-shaped Red Blood Corpuscles in a Case of Severe Anemia. v. 74, p. 543–548, 2001.
- HIGGS, D. . et al. A Review of the Molecular Genetics of the Human alpha-Globin Gene Cluster. **Blood**, v. 73, n. 5, p. 1081–1104, 1989.
- HOFFBRAND, A. .; PETTIT, J. .; MOSS, P. A. . **Fundamentos em Hematologia**. Quarta ed. [s.l.] ARTMED, 2004.
- HOPPE, C. C. Prenatal and newborn screening for hemoglobinopathies. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 35, n. 3, p. 297–305, 2013.
- HUMBERT, J. . et al. Neutrophil Dysfunctions in Sickle Cell Disease. **Biomed & Pharmacother**, v. 44, p. 153–158, 1990.
- KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 1–22, 2018.
- KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 750–760, 2017.
- KI, K. K. et al. Platelet concentrates modulate myeloid dendritic cell immune responses. **Platelets**, v. 7104, n. May, p. 1–10, 2017.
- LARD, L. R. et al. Neutrophil activation in sickle cell disease. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 66, p. 411–415, 1999.
- LERVOLINO, L. G. et al. Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 1, p. 49–54, 2011.
- LEW, V. L.; BOOKCHIN, R. M. Ion Transport Pathology in the Mechanism of Sickle Cell Dehydration. p. 179–200, 2005.
- LI, Q. et al. Locus control regions. **Blood**, v. 100, n. 9, p. 3077–3086, 2002.
- LIU, Y. et al. HO-1hi patrolling monocytes protect against vaso-occlusion in sickle cell disease. **Blood**, v. 131, n. 14, p. 1600–1610, 2018.
- LUIZA-SILVA, M. et al. Cytokine Signatures of Innate and Adaptive Immunity in 17DD Yellow Fever Vaccinated Children and Its Association With the Level of Neutralizing Antibody. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 6, p. 873–883, 2011.

- MADIGAN, C.; MALIK, P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies; Part I: Sick cell disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 8, n. 9, p. 1–23, 2006.
- MANFREDINI, V.; CASTRO, S.; WAGNER, S. A fisiopatologia da anemia falciforme. **Infarma**, v. 19, n. 1/2, p. 3–6, 2007.
- MARENCO-ROWE, A. J. Structure-function relations of human hemoglobins. p. 239–245, 2006.
- MARTINEZ, P. A. et al. Haemoglobinopathies in Europe: health & migration policy perspectives. v. 9, n. 1, p. 1–7, 2014.
- MEKONTSO DESSAP, A. et al. Environmental Influences on Daily Emergency Admissions in Sick Cell Disease Patients. **Medicine**, v. 93, n. 29, p. e280, 2014.
- MENDONÇA, R.; SILVEIRA, A. A. A.; CONRAN, N. Red cell DAMPs and inflammation. **Inflammation Research**, v. 65, n. 9, p. 665–678, 2016.
- MODELL, B.; DARLISON, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 86, n. 8, p. 480–487, 2008.
- MOHANTY, D. A century after discovery of sickle cell disease: Keeping hope alive! **Indian Journal of Medical Research**, v. 139, n. JUN, p. 793–795, 2014.
- MOUSINHO-RIBEIRO; CARDOSO; SOUSA, M. P. Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, n. 91, 2008.
- MUSA, B. O. P. et al. Pattern of Serum Cytokine Expression and T-Cell Subsets in Sick Cell Disease Patients in Vaso-Occlusive Crisis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 4, p. 602–608, 2010.
- NAGEL, R. L.; FABRY, M. E.; STEINBERG, M. H. The paradox of hemoglobin SC disease. **Blood Reviews**, v. 17, n. 3, p. 167–178, 2003.
- NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. Primeira ed. São Paulo: Sarvier, 1997a.
- NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. Primeira ed. São Paulo: Sarvier, 1997b.
- NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. v. 22, n. 1, p. 5–22, 2000.
- NETO, G. C. DE G.; PITOMBEIRA, M. DA S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 51–56, 2003.
- ODIÈVRE, M. H. et al. Pathophysiological insights in sickle cell disease. **Indian Journal of Medical Research**, v. 134, n. 10, p. 532–537, 2011.
- OLWOYEYE, A.; OKWUNDU, C. Gene therapy for sickle cell disease. **Cochrane Database**

of **Systematic Reviews**, n. 11, 2012.

ORKIN, S. H. Regulation of globin gene expression in erythroid cells. v. 281, p. 271–281, 1995.

OSARO, E.; ADIAS, T. The challenges of meeting the blood transfusion requirements in Sub-Saharan Africa: the need for the development of alternatives to allogenic blood. **Journal of Blood Medicine**, p. 7, 2011.

OSÓRIO-BORGES, M. .; ROBINSON, W. **Genética Humana**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1993.

PATRINOS, G. P.; KOLLIA, P.; PAPADAKIS, M. . Molecular Diagnosis of Inherited Disorders : Lessons From Hemoglobinopathies. **Human Mutation**, v. 26, n. September, p. 399–412, 2005.

PERELMAN, N. et al. Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity. **Growth (Lakeland)**, v. 102, n. 4, p. 1506–1514, 2003.

PULE, G.; WONKAM, A. Treatment for sickle cell disease in Africa: Should we invest in haematopoietic stem cell transplantation? **Pan African Medical Journal**, v. 18, p. 1–5, 2014.

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

RUSANOVA, I. et al. β -globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Panamá. **American Journal of Human Biology**, v. 23, n. 3, p. 377–380, 2011.

SARAF, S. L. et al. Differences in the clinical and genotypic presentation of sickle cell disease around the world. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 15, n. 1, p. 4–12, 2014.

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine Hemoglobin structure Hemoglobin function. p. 1–16, 2008.

SILVA-PINTO, A. C. et al. Clinical and hematological effects of hydroxyurea therapy in sickle cell patients: a single-center experience in Brazil. **São Paulo medical journal = Revista paulista de medicina**, v. 131, n. 4, p. 238–43, 2013.

SILVA, A. K. O Contexto Epidemiológico E Biossocial Da Doença Falciforme No Pará , Amazônia , Brasil. **Revista da ABPN**, v. 7, n. 16, p. 103–127, 2015.

SONATI, M. D. F.; COSTA, F. F. The genetics of blood disorders : hereditary hemoglobinopathies. v. 84, p. 40–51, 2008.

STEINBERG, M. H. Genetic Etiologies for Phenotypic Diversity in Sickle Cell Anemia. **The Scientific World JOURNAL**, v. 9, p. 46–67, 2009.

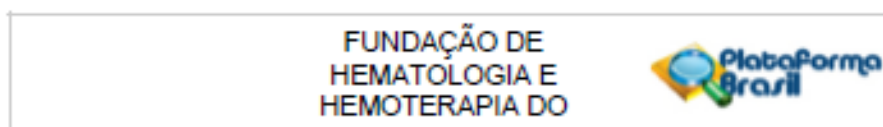
STUART, M. J.; NAGEL, R. L.; JEFFERSON, T. Sickle-cell disease. 2004.

TAYLOR, R. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. **Journal of Diagnostic Medical Sonography**, v. 6, p. 35–39, 1990.

- THEIN, S. L. Genetic association studies in α -hemoglobinopathies. **Hematology**, v. 2013, n. 1, p. 354–361, 2013.
- THOM, C. S. et al. Hemoglobin Variants : Biochemical Properties and Clinical Correlates. 2013.
- URBINATI, F.; MADIGAN, C.; MALIK, P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies; Part I: Sickle cell disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 8, n. 9, p. 1–23, 2006.
- VILAS-BOAS, W. et al. Association of homocysteine and inflammatory-related molecules in sickle cell anemia. **Hematology**, v. 4, p. 151221032123003, 2015.
- VINGERT, B. et al. Partial dysfunction of Treg activation in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 3, p. 261–266, 2014.
- WALLACE, K. L. et al. NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN- γ and CXCR3 chemokines. v. 114, n. 3, p. 667–677, 2019.
- WUN, T. et al. Activated monocytes and platelet-monocyte aggregates in patients with sickle cell disease. **Clinical and Laboratory Haematology**, v. 24, n. 2, p. 81–88, 2002.
- ZHANG, D. et al. Neutrophils , platelets , and in fl ammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. v. 127, n. 7, p. 801–810, 2016.

ANEXOS

Anexo I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 5641331690000.0009)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Potenciais Biomarcadores Celulares e Solúveis Associados a Diferentes Haplótipos e Fenótipos de Anemia Falciforme.

Pesquisador: Nadja Pinto Garcia

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56413316.9.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.854.640

Apresentação do Projeto:

As doenças falciformes (DFs) são as desordens monogênicas mais prevalentes, responsáveis por alta mortalidade e morbidade com uma sobrevivência média estimada de 45 a 48 anos na sociedade ocidental, consistindo em um problema de saúde pública em várias nações (Van Beers et al., 2015).

Trata-se de um estudo observacional analítico transversal. Amostragem: Pacientes diagnosticados com anemia falciforme, tanto em crises vaso-oclusivas quanto em estado estacionário, atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-HEMOAM por

livre demanda, localizada na cidade de Manaus-AM. Os indivíduos enquadrados no grupo controle serão doadores de sangue, coletados ao acaso, sem doenças aparentes. Coleta de Dados e Material Biológico: A coleta de dados e amostra biológica será realizada na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHEMOAM, onde os indivíduos serão abordados e convidados a participar da pesquisa e assinar em

seguida o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE e posteriormente será aplicado um questionário estruturado, com itens como:

Número de identificação, nome do candidato amostrado, sexo, idade, local de nascimento e origem; dados sobre a sintomatologia da doença, tipos de infecções, uso de medicamentos,

Endereço: Av. Constantino Nery 4307 BLD Dr. Era Peaq
 Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (02)3655-0114 Fax: (02)3655-0112 E-mail: cep@hemoram.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.064.640

número de transfusões.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar potenciais biomarcadores celulares e solúveis associados a diferentes haplótipos e fenótipos de pacientes com anemia falciforme.

Objetivo Secundário:

- Caracterizar o perfil fenotípico funcional de leucócitos circulantes envolvidos na resposta inflamatória na anemia falciforme;
- Dosar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e regulatórias circulantes em pacientes com anemia falciforme;
- Descrever os haplótipos dos pacientes com anemia falciforme e relacioná-los com os fenótipos clínicos e imunológicos.
- Determinar a frequência alélica dos polimorfismos do receptor NLRP3;
- Relacionar os perfis de citocinas com os polimorfismos do receptor NLRP3.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Durante a participação no projeto, os pacientes estarão sujeitos aos riscos inerentes a coleta de material biológico por punção venosa durante as crises vaso-oclusivas e em estado estacionário; Poderão ter seus dados pessoais e de prontuários expostos aos pesquisadores do projeto, porém será mantido em sigilo a privacidade dos participantes da pesquisa durante todas as fases da pesquisa.

Benefícios:

O projeto consiste em pesquisa básica com intuito de determinar um biomarcador preditor de mudanças na intervenção clínica de pacientes com anemia falciforme. Com isso, pode proporcionar subsídios para pesquisas clínicas voltadas para diminuir a morbidade e assim melhorar a qualidade de vida dos portadores dessa hemoglobinopatia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa interessante e bem descrita que nos proporcionará maior conhecimento sobre a anemia falciforme.

Endereço: Av. Constantino Nery 4337 SLD Dir Era Paiz
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (02)3655-0114 Fax: (02)3655-0112 E-mail: cep@hemoen.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.064.040

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos solicitados foram anexados, vale apenas ressaltar a importância da identificação no TCLE como primeira e segunda via (participante e pesquisador).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_710211.pdf	21/09/2016 18:26:33		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCompleto.pdf	21/09/2016 18:26:12	Nadja Pinto Garcia	Acelto
Outros	Carta_resposta_Comite.pdf	21/09/2016 18:19:17	Nadja Pinto Garcia	Acelto
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Evlasio.pdf	21/09/2016 17:55:11	Nadja Pinto Garcia	Acelto
Outros	Anuencia_Departamento_Atendimento_Paciente.pdf	21/09/2016 17:51:01	Nadja Pinto Garcia	Acelto
Outros	Anuencia_Departamento_AnalisesClinicas.pdf	21/09/2016 17:50:31	Nadja Pinto Garcia	Acelto
Outros	Anuencia_Departamento_Atendimento_Doador.pdf	21/09/2016 17:49:38	Nadja Pinto Garcia	Acelto
Brochura Pesquisa	Projeto_GuardaChuva_Completo.pdf	21/09/2016 17:43:18	Nadja Pinto Garcia	Acelto
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	20/05/2016 12:11:12	Nadja Pinto Garcia	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Triagem_Facientes.pdf	11/05/2016 23:05:19	Nadja Pinto Garcia	Acelto
Declaração de Pesquisadores	Anuencias_Pesquisadores.pdf	11/05/2016 22:43:41	Nadja Pinto Garcia	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_Instituicao.pdf	11/05/2016 22:42:40	Nadja Pinto Garcia	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Av. Constantino Nery 4387 BLD Dr Eric Paes
Bairro: Chapeda CEP: 69.050-002
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemocm.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Processo: 1.004.040

Não

MANAUS, 13 de Dezembro de 2016

Assinado por:
Elisa Brocina de Leon
(Coordenador)






Anexo II: Artigo Publicado na revista Journal of Immunology Research.

Hindawi
Journal of Immunology Research
Volume 2020, Article ID 4585704, 22 pages
<https://doi.org/10.1155/2020/4585704>



Research Article

Sickle Cell Anemia Patients Display an Intricate Cellular and Serum Biomarker Network Highlighted by TCD4+CD69+ Lymphocytes, IL-17/MIP-1 β , IL-12/VEGF, and IL-10/IP-10 Axis

Nadja Pinto Garcia ^{1,2}, Alexander Leonardo S. Júnior ³, Geysa Adriana S. Soares,⁴ Thainá Cristina C. Costa,³ Alicia Patrino C. dos Santos,⁴ Allyson Guimarães Costa ^{1,2,3}, Andréa Monteiro Tarragó ², Rejane Nina Martins,² Flávia do Carmo Leão Pontes,² Emerson Garcia de Almeida,³ Erich Vinícius de Paula,^{3,5} Olindo Assis Martins-Filho,⁶ and Adriana Malheiro ^{1,2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 69077-000 Manaus, AM, Brazil

²Laboratório de Genômica, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), 69050-001 Manaus, AM, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia, Universidade Estadual do Amazonas (PPCAH/UEA), 69065-001 Manaus, AM, Brazil

⁴Programa de Apoio a Iniciação Científica, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), 69050-001 Manaus, AM, Brazil

⁵Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

⁶Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou/Fiocruz Minas, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

Correspondence should be addressed to Nadja Pinto Garcia; garcia.nadja@gmail.com and Adriana Malheiro; malheiroadriana@yahoo.com.br

Received 15 April 2019; Revised 14 November 2019; Accepted 27 November 2019; Published 8 January 2020

Academic Editor: Martin Holland

Copyright © 2020 Nadja Pinto Garcia et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Sickle cell anemia (SCA) is associated with a chronic proinflammatory state characterized by elevated leukocyte count, mortality from severe recurrent infections, and subsequent vasoocclusive complications with leukocyte adhesion to the endothelium and increased plasma levels of inflammatory cytokines. The immune system has a close connection with morbidity in SCA, but further studies are needed to uncover the involvement of innate and adaptive immunities in modulating the SCA pathophysiology. We performed measurements of the frequency of innate and adaptive immunity cells, cytokines, chemokines, and growth factors and immunophenotyping of Toll-like receptor and adhesion molecule expression in the blood of SCA patients and healthy donors to evaluate the different profiles of these biomarkers, the relationship among them, and their correlation to laboratory records and death risk. **Material and Methods.** Immunophenotyping of cells, Toll-like receptors, and adhesion molecules were performed from peripheral blood samples of SCA patients and healthy donors by flow cytometry and cytokine/chemokine/growth factor measurement by the Luminex technique performed from the serum of the same subjects. **Results.** Cells of adaptive immunity such as IL-12, IL-17, and IL-10 cytokines; IL-8, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES chemokines; and VEGF, FGF-basic, and GM-CSF growth factors were higher in SCA patients than healthy donors regardless of any laboratorial and clinical condition. However, high death risk appears to have relevant biomarkers. **Conclusion.** In the SCA pathophysiology at steady state, there is a broad immunological biomarker crosstalk highlighted by TCD4+CD69+ lymphocytes, IL-12 and IL-17 inflammatory and IL-10 regulatory cytokines, MIP-1 α , MIP-1 β , and IP-10 chemokines, and VEGF growth factor. High expression of TLR2 in monocytes and VLA-4 in TCD8+ lymphocytes and high levels of MIP-1 β and RANTES appear to be relevant in high death risk conditions. The high reticulocytosis and high death risk conditions present common correlations, and there seems to be a balance by the Th2 profile.